

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**LA FOSFATASA DUSP10 ES UN GEN INDUCIDO POR LA CICLOOXIGENASA-2,
IMPLICADO A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE YAP1 EN EL DESARROLLO DEL
CÁNCER COLORRECTAL**

Tesis doctoral

MARTA JIMÉNEZ MARTÍNEZ

Madrid, Mayo de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**LA FOSFATASA DUSP10 ES UN GEN INDUCIDO POR LA CICLOOXIGENASA-2,
IMPLICADO A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE YAP1 EN EL DESARROLLO DEL
CÁNCER COLORRECTAL**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología **Marta Jiménez Martínez** para optar al grado de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología.

Directores de tesis:

Dr. Manuel Fresno Escudero
Dr. Konstantinos Stamatakis Andriani

Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’

Madrid, Mayo de 2017



Departamento de Biología Molecular

D. Manuel Fresno Escudero, Catedrático del Dpto. de Biología Molecular de la UAM,

CERTIFICA:

Que Dña. Marta Jiménez Martínez, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid y Master Interuniversitario en Genética y Biología Celular por la Universidad Autónoma de Madrid, la Universidad Complutense y la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: *La fosfatasa DUSP10 es un gen inducido por la ciclooxigenasa-2, implicando a través de la regulación de YAP1 en el desarrollo del cáncer colorrectal.*

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Biología Molecular para su estimación por la Comisión de Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid, al considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología.

En Madrid, a 8 de mayo de 2017

El Director y Tutor de Tesis: **Dr. Manuel Fresno Escudero**

Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
28049 Madrid

Esta memoria presentada por **Dña. Marta Jiménez Martínez** para optar al grado de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología por la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizada en el *Laboratorio de Activación del Sistema Inmune* dirigido por el Dr. Manuel Fresno Escudero en el Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’.

La Doctoranda ha disfrutado de una beca pre-doctoral de la Fundación Severo Ochoa (RD 1493/2011) y contrato por la UAM para Investigadores Predoctorales concedido por la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI) de la CAM y Fondo Social Europeo (PEJD-2016/BMD-2224). Este trabajo ha sido financiado por la ayuda a Proyecto de Investigación *“Prostanoides y Receptores Tipo Toll como Mediadores Clave y Potenciales Dianas Terapéuticas Enfermedades Inflamatorias Crónicas: Cáncer y Obesidad”* (SAF2013-42850-R) otorgada por el MINECO.

A mis padres, a mi hermana, a mi familia.

A todas esas personas realmente importantes que han formado parte de mi vida, de esta etapa, y hacen de mi lo que soy.

“Que descubrir el misterio de las cosas sea lo más bonito que puedes encontrar...

...y que de repente al encontrarlo te quedes sin respiración”

ABSTRACT/RESUMEN

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) has the second highest incidence and mortality in developed countries. Nowadays, there is not an efficient therapeutic option for this disease. CRC is a consequence of increased proliferation of mucosal epithelium and its glands; it may be the most dangerous cancer because of its metastatic capacity and acquisition of chemoresistance. Cyclooxygenase-2 (COX2) expression is elevated during carcinogenesis, resulting in an increase in prostaglandin levels, which promotes CRC development. COX2 has been proposed as a pharmacological target in CRC treatment, although its inhibition may result in severe secondary effects. In this thesis project, we identified the dual-specificity phosphatase 10 (DUSP10) as a COX2-inducible gene that could be mediating the pro-neoplastic effects of COX2 activity. DUSP10 negatively regulates both c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK (p38), members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily, which controls wide cellular responses implicated in cell proliferation, survival, apoptosis, metastasis and angiogenesis. These processes are very important in CRC development. Our results show DUSP10 specifically dephosphorylated p38 and promoted *in vitro* proliferation of CRC cell lines and *in vivo* tumor growth after xenograft in immunosuppressed mice. DUSP10 nuclear localization correlated with lower survival in colon cancer patients. Moreover, we demonstrated for the first time that stressors such as serum-deprivation, osmotic stress and genotoxicity induced DUSP10 expression. Finally, DUSP10 conferred a growth advantage during proliferation contact inhibition via interaction with the YAP1 protein. Overall, this work presents the pro-tumor role of DUSP10, promoting cell proliferation and CRC development through p38, YAP1 and CDK2 protein regulation.

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo cáncer con mayor incidencia y que mayor número de fallecimientos causa al año en países desarrollados. Actualmente, no existe una opción terapéutica totalmente efectiva para esta enfermedad. El CCR es resultado de la alta proliferación de las células epiteliales de la mucosa del colon y sus glándulas, siendo uno de los más peligrosos por su alta capacidad metastásica y la adquisición de quimioresistencia. El desarrollo tumoral se inicia a través de diversos factores genéticos que comprenden mutaciones y alteraciones en la expresión de genes, o factores ambientales como la inflamación crónica. Durante la carcinogénesis, los niveles de expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX2) aumentan generando altos niveles de prostaglandinas (PG), lo que contribuye al desarrollo del CCR. COX2 ha sido propuesta como diana farmacológica en el tratamiento del CCR, aunque su inhibición puede provocar graves efectos secundarios. En este trabajo identificamos a la fosfatasa dual específica 10 (DUSP10) como un gen inducible por la actividad COX2 y que podría estar mediando parte de los efectos pro-neoplásicos de COX2. DUSP10 regula negativamente a la kinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK) y p38 MAPK (p38). Ambas proteínas, pertenecientes a la superfamilia de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), controlan un amplio conjunto de respuestas celulares implicadas en proliferación, supervivencia, apoptosis, metástasis y angiogénesis, todas ellas importantes en el desarrollo del CCR. Nuestros resultados muestran que DUSP10 desfosforila específicamente a p38, promoviendo la proliferación celular *in vitro* en líneas de CCR y el desarrollo tumoral *in vivo* usando modelos de xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos. La presencia de DUSP10 en el núcleo se relaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de colon. Además, por vez primera demostramos que estreses como la privación de suero, el estrés osmótico y la genotoxicidad inducen la expresión de DUSP10. Finalmente, DUSP10 confiere una ventaja proliferativa evadiendo la inhibición de la proliferación por contacto a través de la interacción con YAP1. En conjunto, este trabajo pone de manifiesto el papel pro-tumoral de DUSP10, promoviendo la proliferación celular y el desarrollo del CCR a través de la regulación de las proteínas p38, YAP1 y CDK2.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Cáncer colorrectal	11
2. Patologías intestinales asociadas a la inflamación.....	12
2.1. Enfermedades inflamatorias intestinales.....	12
2.1.1. Enfermedad de Crohn	13
2.1.2. Colitis ulcerosa.....	13
2.2. CCR asociado a la inflamación.....	14
3. Biosíntesis de prostanoideos	15
3.1. Ciclooxygenasas	15
3.2. Prostaglandina E ₂	16
3.3. Prostaglandina F _{2α}	17
4. COX2 en la patología del CCR.....	17
4.1. Mecanismo pro-tumoral	17
4.2. Regulación de la inflamación	18
5. Familia de las MAPK.....	19
5.1. Señalización de la cascada de MAPK.....	20
5.2. El papel de las MAPK en el cáncer	21
5.2.1. Kinasa regulada por señales extracelulares: ERK	21
5.2.2. Kinasas inducidas por estrés: JNK y p38.....	21
5.3. p38 en el cáncer colorrectal.....	22
5.4. Estrés fisiopatológicos asociados a la activación de p38.....	22
6. Fosfatasa duales (DUSP).....	23
6.1. Fosfatasa dual 10 específica de las MAPK.....	25
6.2. DUSP10 en la regulación de JNK y p38 en la fisiopatología tisular	26
6.3. Papel de DUSP10 en el cáncer colorrectal	27
7. Ruta Hippo	27
7.1. Señalización a través de YAP	28
7.2. Regulación de YAP a través de la señalización de Hippo	28
7.2.1. Ruta “canónica” o dependiente de LATS.....	28
7.2.2. Ruta “no canónica” o independiente de LATS.....	29
7.3. Respuesta de YAP a la densidad celular	30

OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Materiales.....	37
1.1. Líneas y cultivos celulares.....	37
1.2. Plásmidos de expresión	37
1.3. Soluciones.....	39
1.4. Reactivos.....	39
1.5. Anticuerpos	41
1.6. Sondas para RT-PCR cuantitativa.....	43
2. Métodos.....	44
2.1. Transfección transitoria.....	44
2.2. Clonaje y crecimiento bacteriano.....	44
2.3. Expresión estable.....	45
2.4. Obtención y análisis de ADN	46
2.5. Obtención y análisis de ARN	46
2.5.1. Extracción de ARN.....	46
2.5.2. RT-PCR cuantitativa.....	46
2.6. Obtención y análisis de proteínas	47
2.6.1. Extracción de proteína total	47
2.6.2. Extracción de proteínas citosólicas y nucleares.....	47
2.6.3. Análisis por electroforesis e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	48
2.7. Inmunoprecipitación	48
2.8. Inmunofluorescencia	49
2.9. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	49
2.10. Ensayos de proliferación y supervivencia.....	50
2.10.1. Contaje celular	50
2.10.2. Crecimiento a tiempo real	50
2.10.3. Formación de colonias	50
2.10.4. Ensayo colorimétrico MTT	50
2.10.5. Ensayo fluorimétrico <i>AlamarBlue</i> ®	51
2.10.6. Incorporación de timidina tritiada	51
2.11. Ensayos celulares <i>in vitro</i>	52
2.11.1. Densidad celular.....	52

2.11.2. Ausencia de suero	52
2.11.3. Genotoxicidad	52
2.11.4. Estrés osmótico	52
2.12. Histología e inmunohistoquímica	52
2.13. Modelos <i>in vivo</i>	54
2.13.1. Xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos	54
2.13.2. Modelo de cáncer asociado a colitis (CAC).....	54
2.14. Análisis estadísticos	55
RESULTADOS	57
1. <i>DUSP10</i> es un gen inducido por la actividad de COX2 en el CCR.....	59
1.1. <i>DUSP10</i> se induce por COX2	60
1.2. Regulación de <i>DUSP10</i> por PGE ₂ y PGF _{2α}	61
2. Efecto de <i>DUSP10</i> en el fenotipo <i>in vitro</i> de célula de CCR	64
2.1. <i>DUSP10</i> desfoforila p38	64
2.2. <i>DUSP10</i> incrementa la proliferación celular	64
2.3. <i>DUSP10</i> regula el ciclo celular	67
3. <i>DUSP10</i> promueve la evasión de la inhibición por contacto a través de YAP1	68
3.1. La alta densidad induce la expresión de <i>DUSP10</i> y YAP1	68
3.2. La expresión en alta densidad en líneas de CCR depende de los niveles de <i>DUSP10</i>	68
3.3. <i>DUSP10</i> y YAP1 se translocan al núcleo en alta densidad celular	71
3.4. La localización subcelular de <i>DUSP10</i> y YAP1 depende de la densidad celular y la línea celular.....	72
3.5. YAP1 interacciona con <i>DUSP10</i> y p38 en condiciones de alta densidad	73
3.6. La inhibición de YAP1 y p38 altera la proliferación en las líneas celulares de CCR	74
3.7. <i>DUSP10</i> regula los niveles de <i>CDH1</i> en condiciones de AD	75
3.8. Alteraciones en el ciclo celular en AD dependen de la expresión de <i>DUSP10</i>	78
3.9. <i>DUSP10</i> regula las proteínas de ciclo celular en respuesta a la densidad celular	79
4. Efecto de <i>DUSP10</i> sobre la formación y el desarrollo tumoral en el cáncer de colon.....	81
4.1. Estudio <i>in silico</i> de genes relacionados con <i>PTGS2</i> , <i>DUSP10</i> y YAP1 en el CCR.....	81
4.2. La proteína YAP1 está regulada por la ruta de COX2 a través de PGF _{2α}	83
4.3. <i>DUSP10</i> promueve el desarrollo de xenoinjertos tumorales <i>in vivo</i>	84
4.4. La expresión de COX2, <i>DUSP10</i> , YAP1 y p38 fosforilado correlacionan en CCR.....	89
4.5. La presencia de <i>DUSP10</i> nuclear correlaciona con la supervivencia en pacientes con CCR	92

5. Implicación de DUSP10 en la inflamación intestinal	94
5.1. La expresión de DUSP10 dependiente de COX2 está alterada en pacientes con IBD	94
5.2. Expresión de DUSP10 y YAP1 en CAC en ratones.....	96
6. La respuesta a estreses en el ambiente tumoral mediada por DUSP10	98
6.1. Contextualización de DUSP10 en cáncer de colon y su resistencia a quimioterapia a través de la biología de sistemas.....	98
6.2. Resistencia conferida por DUSP10 al estrés genotóxico provocado por los quimioterapéuticos	99
6.3. Inducción de genes asociados a la ruta Ca^{2+} /COX/PG/DUSP10 por estrés osmótico	102
6.4. Implicación de DUSP10 en el estrés fisiológico por privación de suero.....	104
DISCUSIÓN.....	111
1. Relación de DUSP10 con la actividad de COX2/PG en el CCR.....	113
2. El papel pro-tumoral de DUSP10 en el desarrollo del CCR junto a COX2 y YAP1.....	114
3. Interacción de DUSP10 y YAP1	118
4. Implicación de DUSP10 en la regulación del ciclo celular	120
5. DUSP10 en la resistencia a los quimioterapéuticos	122
6. Resumen	123
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXO I: Publicaciones	153

ABREVIATURAS

μM	Micromolar
³H	Timidina tritiada
5FU	5-Fluorouracilo
AA	Ácido araquidónico
aa	Aminoácido
AAD	Aminoactinomicina D
ABL	Oncogen murino de leucemia viral <i>Abelson</i>
ACN	Calcineurina activa (<i>siglas en ingles</i>)
AD	Alta densidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINES	Antiinflamatorio no esteroideo
AKT	Serina/threonina kinasa o proteína kinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AOM	Azoximetano
APC	<i>Adenomatous Poliposis Coli</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección americana de tejidos y cultivos
BCA	Ácido bicinchonínico (<i>siglas en ingles</i>)
BD	Baja densidad
BLI	Bioluminiscencia
BRAF	B-raf proto-oncogen
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>siglas en ingles</i>)
Bsd	Blasticidina
Ca²⁺	Calcio
CAC	Cáncer asociado a colitis
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer
CCR	Cáncer colorrectal
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CDH	Cadherina
CDK	Kinasa dependiente de ciclina
CI	Índice celular (<i>siglas en ingles</i>)
Cn	Calcineurina
CO₂	Dióxido de carbono (<i>siglas en ingles</i>)
COX	Ciclooxygenasa
COXIB	Inhibidor específico de COX2
cpm	Cuentas por minuto
CPT	Campotecina
CS	Control sano
CsA	Ciclosporina A

CsPt	Cisplatino
CT	Vector control
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo (<i>siglas en ingles</i>)
CU	Colitis ulcerosa
CYR	Inductor angiogénico rico en cisteína
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DC	Dominio catalítico
DCC	Proteína de cohesión de cromátidas hermanas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNM	Datos no mostrados
DO	Densidad óptica
DP	Receptor de PGD ₂
DSS	Dextrán sulfato sódico
DU	Dominio de unión
DUSP	Fosfatasa dual específica (<i>siglas en ingles</i>)
EC	Enfermedad de Crohn
E-CDH	E-cadherina
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>siglas en ingles</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>siglas en ingles</i>)
EGR	Proteína de respuesta temprana de crecimiento (<i>siglas en ingles</i>)
EGTA	Ácido tri-etilen-glicodiamino-tetra-acético
EP	Receptor de PGE ₂
ERK	Kinasa regulada por señales extracelulares (<i>siglas en ingles</i>)
ERT	Erlotinib
EV	Vector control
FBS	Suero fetal bovino (<i>siglas en ingles</i>)
FP	Receptor de PGF _{2α}
FSK	Forskolina
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (<i>siglas en ingles</i>)
GFT	Gefitinib
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (<i>siglas en ingles</i>)
H₂Od	Agua destilada
HCl	Ácido clorhídrico (<i>siglas en ingles</i>)
HEPES	Ácido tetra-dihidroxietil-peperazino-etanosulfónico (<i>siglas en ingles</i>)
HPRT	Hipoxantina fosfo-ribosil-transferasa (<i>siglas en ingles</i>)
HRP	Enzima peroxidasa de rábano (<i>siglas en ingles</i>)
HSP	Proteína de choque de calor (<i>siglas en ingles</i>)
Hygro	Higromicina B
IB	Inmunoblot

IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal (<i>siglas en ingles</i>)
IC	Intervalo de confianza
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferon
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IO	Ionóforo de calcio
IP	Inmunoprecipitación
IPC	Inhibición de la proliferación por contacto
IRF	Factor regulador de interferón (<i>siglas en ingles</i>)
ISC	Células madre intestinales (<i>siglas en ingles</i>)
JNK	Kinasa c-Jun NH ₂ -terminal (<i>siglas en ingles</i>)
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio (<i>siglas en ingles</i>)
kDa	Kilo Dalton
KLF	Factor como <i>Krüppel</i> (<i>siglas en ingles</i>)
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral</i> oncogen homólogo
LacZ	Operon Lac: gen codificante de la enzima β -galactosidasa
LB	<i>Luria Bertani</i> (agar)
Luc	Luciferasa
M	Molaridad
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos (<i>siglas en ingles</i>)
MEM	Medio esencial mínimo <i>Eagle</i> (<i>siglas en ingles</i>)
miRNA	Secuencias pequeñas de ARN no codificante
MKP	Fosfatasa de las MAP kinasas (<i>siglas en ingles</i>)
mM	Milimolar
MMR	Genes de reparación de roturas (<i>siglas en ingles</i>)
MPGES	Sintasa microsomal de la PGE ₂ (<i>siglas en ingles</i>)
MSI	Inestabilidad de secuencias microsatélite (<i>siglas en ingles</i>)
mTOR	Kinasa diana de rapamicina en mamíferos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-dipheniltetrazolium bromide
MUC	Proteína mucina intestinal
NaCl	Cloruro sódico (<i>siglas en ingles</i>)
NFAT	Factor nuclear de células T activadas (<i>siglas en ingles</i>)
ns	No significativo
OCT	Compuesto de temperatura óptima para cortar (<i>siglas en ingles</i>)
OxPt	Oxaliplatino
P38	Proteína activada por estrés p38
P53	Proteína tumoral p53
PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida (<i>siglas en ingles</i>)

pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>siglas en ingles</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>siglas en ingles</i>)
PFA	Paraformaldehído
PG	Prostaglandina
PGD	Prostaglandina D ₂
PGE	Prostaglandina E ₂
PGES	Sintasa de la PGE ₂ (<i>siglas en ingles</i>)
PGF	Prostaglandina F _{2α}
PGFS	Sintasa de la PGF _{2α} (<i>siglas en ingles</i>)
PGG	Prostaglandina G ₂
PGH	Prostaglandina H ₂
PGI	Prostaciclina
PI	Yoduro de propidio (<i>siglas en ingles</i>)
PIK3CA	Fosfatidil-inositol-3,4-bisfosfato kinasa 3 catalítica (<i>siglas en ingles</i>)
PKC	Proteína kinasa C
PLC	Fosfolipasa C (<i>siglas en ingles</i>)
PSTPL	Proteína Ser/Thr parecida a fosfatasa (<i>siglas en ingles</i>)
PTGER	Gen del receptor de la PGE ₂
PTGFR	Gen del receptor de la PGF _{2α}
PTGS	Sintasa de prostaglandina-endoperoxido (<i>siglas en ingles</i>)
PTP	Fosfatasa de proteína Tyr (<i>siglas en ingles</i>)
PTPN	Fosfatasa de proteína Tyr, tipo no-receptor (<i>siglas en ingles</i>)
PTSTP	Fosfatasa Ser/Thr específica (<i>siglas en ingles</i>)
Puro	Puromicina
qPCR	PCR cuantitativa
RAF	Kinasa rápidamente acelerada en fibrosarcoma (<i>siglas en ingles</i>)
RAS	Proteína de pequeñas GTPasa
RCAN	Regulador de la Calcineurina (<i>siglas en ingles</i>)
RHO	Proteína GTPasa Rho
RPM	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo relativo
RT	Transcripción inversa (<i>siglas en ingles</i>)
SCR	Vector control del inserto de <i>shRNA</i>
SD	Desviación estándar (<i>siglas en ingles</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>siglas en ingles</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>siglas en ingles</i>)
Ser	Serina
shRNA	Pequeño ARN en horquilla
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (<i>siglas en ingles</i>)
TAE	Solución tamponada con Tris, acetato y EDTA

TBS	Solución salina tamponada con Tris-HCl
Th	Linfocito T ayudante
Thr	Treonina
TMA	<i>Microarray</i> de tejido (<i>siglas en ingles</i>)
TP	Receptor de TXA ₂
TPT	Topotecan IV
tSNP	<i>Tag SNP</i> , pequeño grupo representativo de SNP
TXA	Tromboxano A
Tyr	Tirosina
U	Unidades
UA	Unidades arbitrarias
UTR	Región no traducida de los genes (<i>siglas en ingles</i>)
UV	Ultravioleta
V	Voltio
v	Volumen
VP	Verteporfina
W	Vatio
WB	<i>Western blot</i>
WNT	Familia de sitio de integración MMTV tipo- <i>wingless</i>
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
YAP	Proteína asociada a <i>Yes</i> (<i>siglas en ingles</i>)
YKI	Proteína <i>Yorkie</i>

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer colorrectal.

El cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda causa en países en desarrollo (Jemal et al., 2011). Un total de 1.660.000 nuevos casos de cáncer y 580.000 muertes por cáncer se registraron en Estados Unidos en 2013 (Siegel et al., 2013). El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres (746.000 casos) y el segundo en mujeres (614.000 casos), representando un 10% del total (Ferlay et al., 2015). En España, alrededor de 34.000 nuevos casos de CCR se diagnostican cada año (Sanchez et al., 2010). El CCR junto con el cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de estómago son los causantes de un número alto de fallecimientos por esta enfermedad entre la población española (Fernandez de Larrea-Baz et al., 2009). Hoy en día, no existe una opción terapéutica contra el CCR que resulte totalmente efectiva. La resección quirúrgica, radiación y/o quimioterapia proporcionan una solución temporal, pero en el 40-50% de los casos resurge el tumor y/o aparecen metástasis (Obrand and Gordon, 1997).

El CCR es un tumor maligno, cáncer o neoplasia, resultado de la proliferación de las células epiteliales de la mucosa del colon y sus glándulas unido a una progresiva inhibición de la muerte celular (Kikuchi et al., 1997). Existen dos tipos de CCR en función de la causa que los origina, el cáncer de colon hereditario o familiar y el cáncer de colon esporádico.

El cáncer de colon hereditario o familiar es la consecuencia de la herencia por la línea germinal de mutaciones en genes susceptibles al desarrollo del cáncer. Según la susceptibilidad se diferencia por la aparición de neoplasias benignas (Poliposis Adenomatosa Familiar) o tumores primarios sin presencia de pólipos en el intestino (Cáncer Colorrectal No Poliposis Hereditario) (Sancho et al., 2004).

El cáncer de colon esporádico es el más común con un 75-80% de casos diagnosticados. Las alteraciones que aparecen en dos principales mecanismos moleculares promueven este tipo de cáncer. Por un lado, las alteraciones en la vía “canónica” comprenden mutaciones o deleciones en genes como *KRAS*, *APC*, *DCC* y *p53* que promueven la inestabilidad cromosómica, siendo las más frecuentes en un 80-85% de los CCR esporádicos (Moran et al., 2010). En 1990, Fearon y Vogelstein propusieron que la mutación en tres o cuatro de los citados oncogenes y/o genes supresores es necesaria para iniciar el proceso de tumorigénesis, donde las propiedades finales del tumor se determinan a partir de la acumulación y el orden en el que aparecen las alteraciones (Fearon and Vogelstein, 1990). Diez años después, basándose en el modelo anterior, se describió como las células epiteliales de CCR adquieren las alteraciones genéticas en un orden estricto e involucran a las rutas

de señalización de Wnt y TGF β en la promoción del cáncer (Arends, 2000). Por otro lado, la vía “no-canónica”, también llamada “mutadora”, promueve el 15-20% de los CCR esporádicos. Esta vía “mutadora” depende principalmente de la inestabilidad de las secuencias microsatélites (MSI) en el genoma, lo que provoca la acumulación de mutaciones en los genes de reparación de roturas (MMR) producidos durante la replicación del ADN (Imai and Yamamoto, 2008).

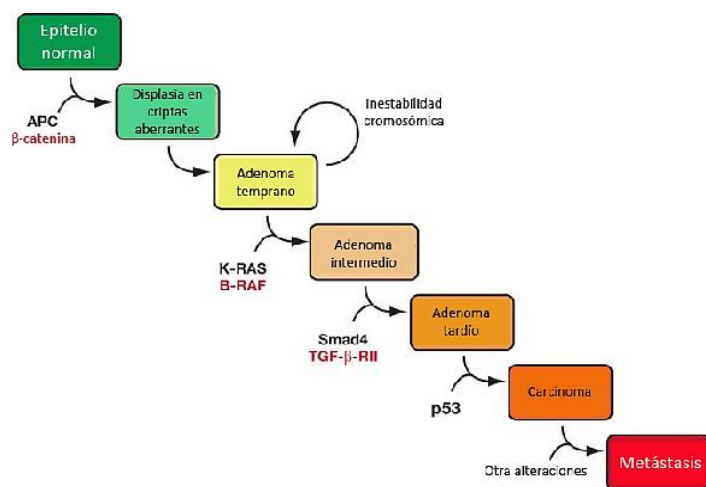


Figura I-1. Esquema asociativo entre las alteraciones genéticas y el desarrollo del CCR. Cada fase del desarrollo tumoral está promovida por la mutación de uno o varios genes. Esquema adaptado de (Fearon and Vogelstein, 1990).

2. Patologías intestinales asociadas a la inflamación.

La relación entre la inflamación, las patologías intestinales y el cáncer ha sido muy revisada en los últimos años, llegando a establecer la inflamación como un proceso clave en el desarrollo tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011).

2.1. Enfermedades inflamatorias intestinales.

Las principales enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), ambas con alta incidencia en la población adulta joven. Estas enfermedades se han incrementado desde mediados del siglo XX y, actualmente, 1.4 millones de personas en Estados Unidos y 2.2 millones de personas en Europa las sufren (Loftus, 2004). Los pacientes con IBD muestran una invasión de la mucosa y del epitelio intestinal por bacterias gastrointestinales que inducen una respuesta inflamatoria mediada principalmente por linfocitos T, granulocitos, macrófagos y células dendríticas (Bene et al., 2011). Alrededor de un 12% de los pacientes de IBD se relacionan con el historial familiar (Moller et al., 2015). Por tanto, la predisposición genética y los factores ambientales juegan un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. En cuanto al aspecto genético, un total de 163 genes han sido relacionados con las IBD y 71 de ellos asociados directamente en la interacción

organismo-microbio (Jostins et al., 2012). En los últimos años, factores de riesgo como el tabaco, la medicación con AINES o el uso de pastillas anti-conceptivas han sido fuertemente asociados con el desarrollo de IBD, mientras que factores como el estilo de vida urbano, una dieta rica en azúcares y grasas o el estrés han sido catalogados como factores influyentes pero no determinantes en ambas enfermedades (Frolkis et al., 2013). En consecuencia, se ha visto como la inflamación es un factor negativo para el desarrollo de las IBD (Del Reino et al., 2014).

2.1.1. Enfermedad de Crohn.

La EC se define como una enfermedad crónica del tracto gastrointestinal que se desarrolla de manera progresiva llevando a dañar y desestabilizar el intestino, más comúnmente la parte terminal, íleon y colon. La edad más frecuente para la aparición de la EC se da en adultos entre 20 y 40 años. En la población mundial, la incidencia es de 12 casos por 100.000 habitantes al año en Europa, 5 casos por 100.000 habitantes al año en Asia y 20 casos por 100.000 habitantes al año en Norte América (Molodecky et al., 2012). Estas estadísticas muestran que únicamente una parte de la enfermedad podría asociarse a causas genéticas, debido a que la mayor parte estaría determinada por factores ambientales. El desajuste de la microbiota juega un papel importante en la respuesta a los factores ambientales y genéticos. Se ha visto que un tercio de los pacientes con EC presentan un incremento de la mucosa intestinal asociada a la invasión de la bacteria *Escherichia coli* (Darfeuille-Michaud et al., 2004).

2.1.2. Colitis ulcerosa.

La CU se define como una enfermedad inflamatoria crónica con recidiva tras largos periodos de tiempo ausente. Normalmente, la inflamación suele aparecer en la zona del recto y extenderse hacia el resto del colon, centrándose únicamente en la mucosa intestinal. Cada año, a nivel mundial, se identifican unos 24 casos por 100.000 habitantes en Europa, 6 casos por 100.000 habitantes en Asia y 19 casos por 100.000 habitantes en Norte América (Molodecky et al., 2012). Diferentes estudios han revelado un mayor riesgo de padecer CU en pacientes con antecedentes familiares (Kaser et al., 2011). La CU a diferencia de la EC presenta desequilibrios claros en la respuesta inmune humoral y celular, con niveles altos de inmunoglobulina (Ig) G de tipo 1 y mayor respuesta dependiente de linfocitos Th2, respectivamente (Heller et al., 2005; Takahashi and Das, 1985). En consecuencia, se ha visto como la autoinmunidad juega un papel importante en la desarrollo de esta enfermedad, detectándose anticuerpos IgG1 circulantes que se dispersan desde el epitelio colónico a otras zonas

como piel, ojos, articulaciones o epitelio biliar causando daños en el organismo (Bhagat and Das, 1994).

2.2. CCR asociado a la inflamación.

En 1863, Rudolf Virchow observó células inmunes en el tejido neoplásico, estableciendo una relación entre inflamación y cáncer. Posteriormente, se sugirió que las células inflamatorias y las citoquinas localizadas en el tejido tumoral estarían favoreciendo la progresión, el crecimiento del tumor y una inmunosupresión que estaría evitando una respuesta inmune antitumoral eficaz (Balkwill and Mantovani, 2001). En los últimos años, se apunta a que un crecimiento tumoral efectivo depende tanto de las células inflamatorias que favorecen a las células tumorales a través de la liberación de factores de crecimiento, como de los componentes del microambiente tumoral que proveen de factores supresores de la respuesta inmune antitumoral (Candido and Hagemann, 2013). Por tanto, se describieron dos rutas en la promoción del cáncer a través de la inflamación: la ruta intrínseca y la ruta extrínseca. La primera estaría controlada por alteraciones genéticas en las células del tejido que promoverían tanto la inflamación como la neoplasia. La segunda vendría dada por señales o condiciones inflamatorias de origen externo al tejido (Mantovani et al., 2008).

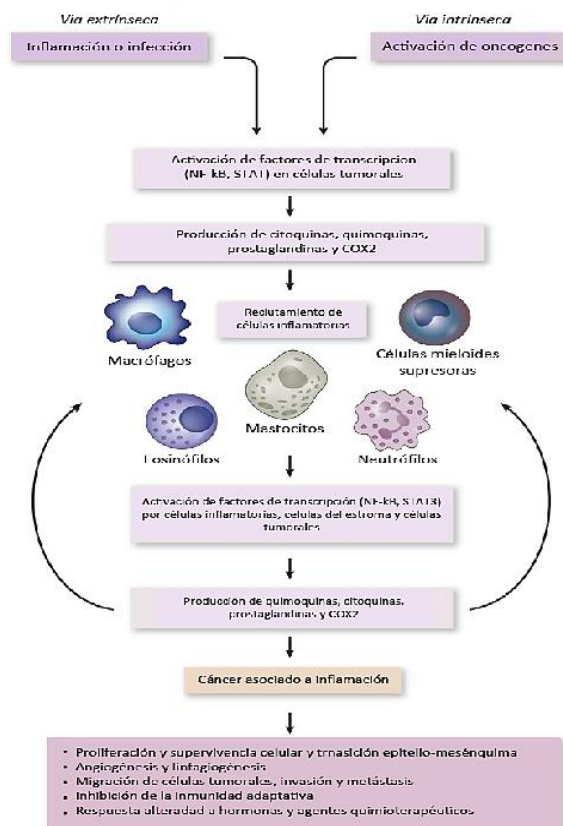


Figura I-2. Rutas de conexión entre la inflamación y el cáncer. Se describe una ruta extrínseca promovida por procesos de inflamación o infección y una ruta intrínseca caracterizada por alteraciones génicas que llevan a la activación de oncogenes. Aparece una comunicación entre las células tumorales, las células inflamatorias y las células del estroma que promueven el desarrollo de cáncer asociado a inflamación. Imagen adaptada de (Mantovani et al., 2008).

En 1928, se relacionó por primera vez la CU con el CCR (Bargen, 1994). Estudios clínicos han demostrado que existe 2.5 veces más riesgo de desarrollar CCR en pacientes con CU y EC (Jess et al., 2012; von Roon et al., 2007). Actualmente, el CCR es la causa de muerte en un 15% de los pacientes con IBD (Bae and Kim, 2014).

3. Biosíntesis de prostanoideos.

Los prostanoideos son moléculas formadas por una cadena de ácidos grasos poliinsaturados de veinte carbonos (Bos et al., 2004). La biosíntesis de prostanoideos comienza con la conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandina G_2 (PGG_2) y, seguidamente, en prostaglandina H_2 (PGH_2) a través de la actividad ciclooxygenasa y peroxidasa, respectivamente, de la enzima ciclooxygenasa (COX). Finalmente, la actividad de determinadas sintasas específicas de prostanoideos dará como resultado un variado grupo de moléculas que incluye la prostaglandina (PG) E_2 (PGE_2), D_2 (PGD_2) y $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), la prostaciclina (PGI_2) y el tromboxano A_2 (TXA_2). Los prostanoideos están implicados en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos como el mantenimiento de la integridad gastrointestinal, las funciones cardiovasculares, renales, cerebrales y nerviosas, la activación y la regulación del sistema inmune o en procesos patológicos como la artritis, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer (Dubois et al., 1998; Iniguez et al., 2008; Iniguez et al., 2003; Sreeramkumar et al., 2012).

3.1. Ciclooxygenasas.

Se han identificado dos isoformas de la enzima COX, COX1 y COX2, codificadas por los genes *PTGS1* (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 1*) y *PTGS2* (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*), respectivamente. Aunque ambas proteínas muestran la misma actividad ciclooxygenasa y peroxidasa, sus diferencias se encuentran en los sustratos diana, el tipo celular, los mecanismos de inhibición y la localización intracelular (Garavito et al., 2002). Por un lado, COX1 está descrita como la isoforma constitutiva, expresándose en la mayoría de los tejidos pero no en todas las células, y siendo responsable de la producción de prostanoideos dentro del marco fisiológico del tejido u órgano (Smith and Dewitt, 1996). Por otro lado, COX2 es considerada la isoforma inducible en respuesta a estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y pro-inflamatorios como citoquinas. Su expresión se encuentra restringida a determinados tejidos o células en algunos casos ligada a condiciones patológicas (Shao et al., 2000; Wang and Dubois, 2010). Se ha descrito que COX1 se localiza preferencialmente en el retículo endoplásmico, mientras que COX2 se encuentra tanto en el retículo endoplásmico como en la envoltura nuclear (Morita et al., 1995).

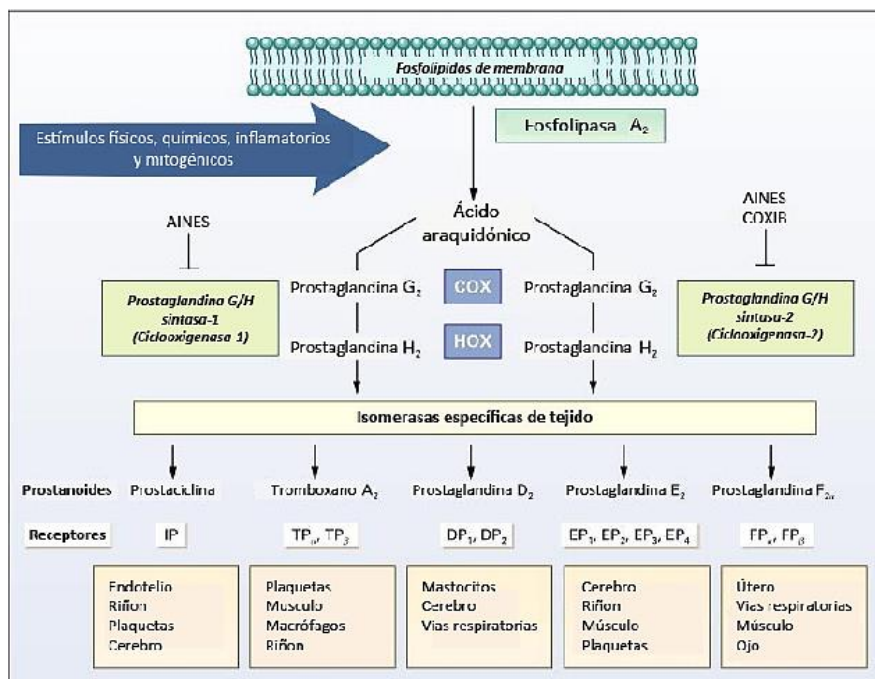


Figura I-3. Biosíntesis y acción de los prostanooides. A partir del ácido araquidónico (AA) se sintetizan los diferentes tipos de prostanooides: prostaciclina (PGI₂), tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGF_{2α}. Se necesita la actividad ciclooxigenasa (COX) y peroxidasa (HOX) de la enzima prostaglandina H₂ (PGH₂) sintasa y la acción de las isomerasas específicas de tejido para la síntesis de dichas proteínas. Ambas sintasas pueden ser inhibidas por compuestos antiinflamatorios no-esteroides (AINES), mientras que la actividad de COX2 es inhibida específicamente por los inhibidores específicos (COXIB). Los prostanooides actúan a través de los receptores específicos situados en las membranas celulares, señalizando principalmente en algunos tejidos y tipos celulares. Imagen modificada de (FitzGerald and Patrono, 2001).

3.2. Prostaglandina E₂.

La PGE₂ es la PG producida en gran medida por la actividad fisiológica de COX2 y media su acción a través de la unión a los receptores de prostanooides-E (EP) localizados en las membranas celulares (Belley and Chadee, 1999). Se han identificado cuatro subtipos de receptores EP (EP1, EP2, EP3, EP4) donde su expresión tejido-específica y su activación desencadena diferentes rutas de señalización que favorecen, por ejemplo, la proliferación celular del epitelio intestinal (Takafuji et al., 2000). Los EP pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y transducen la señalización de PGE₂ a través de diferentes mensajeros intracelulares. Por un lado, EP2 y EP4 incrementan preferentemente los niveles intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) (Alfranca et al., 2006; Regan, 2003). Por otro lado, la activación de EP1 moviliza calcio (Ca²⁺), mientras que la señalización por EP3 moviliza mayoritariamente AMPC (Loffler et al., 2008). La síntesis de PGE₂, a partir de PGH₂, se realiza por la acción de la enzima sintasa de PGE (PGES). Se han identificado tres isoformas: PGES citosólica (cPGES), PGES-1 microsomal (mPGES1) y la PGES-2 microsomal (mPGES2).

cPGES es una isoforma no inducible, expresada constitutivamente en la mayoría de los tejidos y asociada a la actividad de COX1, siendo considerada la isoforma inducida por estímulos pro-inflamatorios y asociada funcionalmente con COX2 (Jakobsson et al., 1999; Tanioka et al., 2000). En este sentido, hemos descrito la inducción conjunta de mPGES-1 a través de un incremento de COX2 y PGE₂ relacionado directamente en patologías como el CCR debido a la implicación del factor de transcripción EGR1 (*Early Growth Response Protein 1*), promoviendo una rápida proliferación celular (Stamatakis et al., 2015).

3.3. Prostaglandina F_{2α}.

La PGF_{2α} es otra PG producida mayoritariamente por la actividad de la sintasa de PGF (PGFS) a partir de PGH₂ y se une específicamente al receptor FP de tipo GPCR (Lake et al., 1994). La señalización por FP lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC) lo que induce al incremento del Ca²⁺ intracelular y a la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Fracchia et al., 2013; Fujino et al., 2000; Rhee, 2001). Sin embargo, PGF_{2α} puede ser sintetizada a través de otras PG como PGE₂ y PGD₂, y puede señalizar a través de otros receptores como EP1 y EP3 (Breyer et al., 2001; Komoto et al., 2006). La capacidad de PGF_{2α} de actuar por medio de las vías independientes de Ca²⁺ o PKC permite variar su señalización intracelular. Por ejemplo, la inducción de COX2 a través de PGF_{2α}/FP puede darse por medio de la activación de Rho y la transcripción mediada por β-catenina/Tcf (Fujino and Regan, 2003). También, se han detectado en células aisladas de las criptas colónicas niveles elevados de AMPc tras el tratamiento con PGF_{2α} (Collins et al., 2009). La señalización dada por las diferentes cascadas desencadena la activación de distintos factores de transcripción como, por ejemplo, AP1 en el cuerpo lúteo, NFAT en células del musculo esquelético o EGR1 en cardiomiocitos (Chen et al., 2001a; Hara et al., 2008; Horsley and Pavlath, 2003).

4. COX2 en la patología del CCR.

4.1. Mecanismo pro-tumoral.

Diversos estudios han descrito como los niveles de expresión de *PTGS2* se encuentran incrementados en un 85% de los adenomas y CCR humano, además de expresar mayores niveles de PG, concretamente, PGE₂ (Eberhart et al., 1994; Sano et al., 1995). Sin embargo, dentro del grupo de polimorfismos descritos para el gen *PTGS2*, sólo el identificado como *PTGS2.9850* se relacionó con un mayor riesgo de CCR (Cox et al., 2004). El uso de ratones *Min/+* como modelo de CCR mostró niveles de COX1 y COX2 elevados en los adenomas formados esporádicamente (Williams et al., 1996). En el

mismo sentido, ratones *Apc*⁷¹⁶ desarrollaron un menor número y tamaño de pólipos tumorales cuando se eliminaba el gen *PTGS2* (Oshima et al., 1996). A nivel funcional, se ha demostrado como una elevada expresión de PGE₂ asociada a una alta expresión de COX2 promueve la iniciación y/o progresión del proceso de carcinogénesis mediante la estimulación de la proliferación y la supresión de la apoptosis en las células tumorales (Abrahao et al., 2010; Kawamori et al., 2003). Del mismo modo, tanto PGE₂ como COX2 han sido implicadas en la diferenciación tumoral de las células epiteliales promoviendo la angiogénesis, incrementando la invasión tisular y favoreciendo la metástasis (Greenhough et al., 2009). Dentro de la acción pro-tumoral de COX2, existen muy pocas evidencias del posible papel de PGF_{2α} en algunos cánceres, excepto la detección de niveles más altos conjuntamente con PGE₂ (Nugent et al., 1996; Pocobutt et al., 2013). Del mismo modo, se ha visto que PGF_{2α} promueve la invasión y la movilidad de las células epiteliales de adenomas y carcinomas de colon en colaboración con PGE₂ (Qualtrough et al., 2007). En el tejido tumoral de pacientes con CCR se ha detectado una regulación diferencial del receptor FP dependiente del estadio del cáncer (Gustafsson et al., 2007).

4.2. Regulación de la inflamación.

Numerosos estudios clínicos realizados a lo largo de varias décadas revelaron como el uso regular de sustancias antiinflamatorias no-esteroides (AINES), entre los que encontramos aspirina, ibuprofeno o sulindac, disminuye un 30-50% la mortalidad en individuos con CCR (Flossmann and Rothwell, 2007; Nan et al., 2015; Thun et al., 1991). En 1993, se realizaron los primeros estudios en ratas que demostraban como el tratamiento con aspirina reducía la incidencia y la multiplicidad de adenocarcinomas de colon relacionados con una reducción de los niveles de PGE₂ en la mucosa colónica (Reddy et al., 1993). En este sentido, el uso de fármacos antiinflamatorios ha resultado ser útil en la prevención y el tratamiento del CCR en los casos donde la expresión de la enzima COX2 se encuentra elevada (Chan et al., 2007). Sin embargo, no hay que perder de vista como mutaciones en genes clave como *PIK3CA* o *APC* pueden influir en la supervivencia al CCR dependiente del uso de aspirina en pacientes con alta expresión de COX2 (Giardiello et al., 1996; Liao et al., 2012). Debido a que los AINES inhiben tanto COX1 como COX2, su uso continuado provoca gastritis, náuseas, úlceras intestinales, perforaciones gastroduodenales y problemas cardiacos (Hawkey, 1996; Wolfe et al., 1999).

Con el fin de evitar los efectos adversos de los AINES, comenzaron a desarrollarse inhibidores selectivos de la enzima COX2 (COXIB), sin afectar la actividad de COX1, como celecoxib, rofecoxib, NS-398 o valdecoxib. Estudios comparativos demostraron que el uso de COXIB disminuía un 64% la posibilidad de desarrollar cáncer en comparación con el 59% o el 49% de disminución que resultaba del uso de ibuprofeno o aspirina, respectivamente (Harris et al., 2012). En modelos murinos se confirmó como el tratamiento con celecoxib o NS-398 redujo el crecimiento de tumores sin generar una fuerte toxicidad gastrointestinal (Kawamori et al., 1998; Williams et al., 2000; Yoshimi et al., 1999). Sin embargo, otros estudios encontraron que la inhibición selectiva de COX2 no es suficiente para evitar el crecimiento y la motilidad de las células tumorales, siendo necesarias otras opciones terapéuticas (Crew et al., 2000; Gallicchio et al., 2008)

5. Familia de las MAPK.

Una de las vías de transducción de señales evolutivamente más conservada es la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Widmann et al., 1999). Dichas proteínas son activadas por estímulos extracelulares y promueven una amplia variedad de respuestas fisiológicas y patológicas en las células y tejidos de mamíferos (Chang and Karin, 2001). Entre las funciones fisiológicas de las MAPK destacan su papel en embriogénesis, inmunidad innata y adquirida, homeostasis metabólica, funciones cardíacas y plasticidad neuronal. Sin embargo, el mal funcionamiento de estas proteínas se asocia con enfermedades como la obesidad o diabetes, artritis reumatoide, neurodegeneración y cáncer (Kyriakis and Avruch, 2012; Lawrence et al., 2008).

La superfamilia de las MAPK está compuesta por un elevado número de proteínas (MAPKKK, MAPKK) que regulan a las kinasas efectoras de la vía, las MAPK. Las proteínas MAPK se dividen en tres principales grupos en mamíferos. Por una lado, las dos familias de proteínas activadas por estrés: la proteína c-Jun NH₂-terminal kinasa (JNK) compuesta por JNK1, JNK2 y JNK3, y la proteína p38 MAPK (p38) formada por las isoformas p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . Por otro lado, la familia de las proteínas kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) está compuesta por ERK1 y ERK2, también denominadas p44 y p42 MAPK, respectivamente (Chen et al., 2001b). Dentro de esta última familia se ha identificado a las proteínas ERK3/4 y ERK7/8 como MAPK “atípicas” con funciones celulares no muy claras (Coulombe and Meloche, 2007). En los últimos años, ha emergido el estudio de la proteína ERK5 como una nueva ruta de señalización dentro de la familia de las MAPK debido a su implicación en el cáncer (Hoang et al., 2017).

5.1. Señalización de la cascada de MAPK.

La señalización a través de MAPK ocurre a través de la activación en cascada por fosforilación de otras proteínas quinasas previas, es decir, la MAPK Kinasa Kinasa (MAPKKK o MEKK) activa y fosforila a MAPK Kinasa (MAPKK o MEK). La MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7 y MKK5 son las quinasas activadoras de ERK1/2, p38, JNK1/2 y ERK5, respectivamente. La MKK activada fosforila los residuos treonina (Thr) y tirosina (Tyr) conservados en el motivo proteico Thr-X-Tyr de las MAPK. El aminoácido X corresponde al ácido glutámico para ERK, prolina para JNK y glicina para p38 (Marshall, 1994). Las respuestas intracelulares dadas por las MAPK abarcan la transcripción de genes implicados en procesos como proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis y respuesta inmune (Rincon and Davis, 2009; Treisman, 1996). Concretamente, se relaciona la señalización por ERK con respuestas implicadas en crecimiento, supervivencia, diferenciación y desarrollo, mientras que la regulación de JNK y p38 se asocia con inflamación, apoptosis, crecimiento y diferenciación (Cuenda and Rousseau, 2007; Wada and Penninger, 2004).

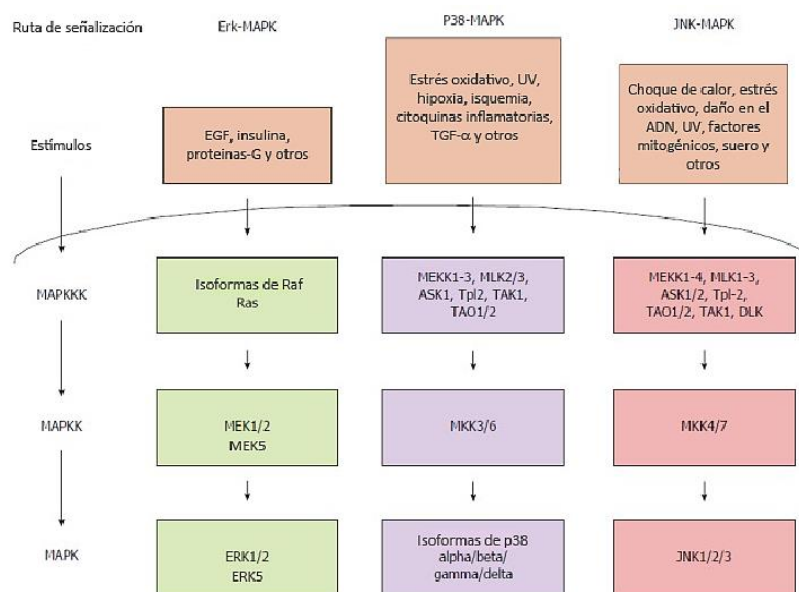


Figura I-4. Cascada de señalización de las MAPK. Diferentes estímulos afectan a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) y las quinasas activadas por estrés (p38α/β/γ/δ y JNK1/2/3) a través de la activación y fosforilación de las MAPKK y MAPKKK en la cascada de señalización. Imagen modificada de (Yang et al., 2015).

Una propiedad altamente conservada dentro de la superfamilia MAPK es que la magnitud y duración de la activación de las quinasas, siendo un factor determinante en el tipo de respuesta celular final. En algunos casos, una activación corta de JNK promueve la supervivencia celular, mientras que una prolongada activación induce la muerte celular por apoptosis (Ventura et al., 2006). En otros

casos, puede darse una regulación negativa de la MAPKK por la propia MAPK, lo que modularía su respuesta final como en el caso de p38 inhibiendo MKK6 (Ambrosino et al., 2003). Del mismo modo, la localización subcelular de la MAPK puede ser determinante en el tipo de respuesta debido, por ejemplo, al sustrato disponible en el lugar de acción (Ebisuya et al., 2005).

5.2. El papel de las MAPK en el cáncer.

La cascada de MAPK no solo promueve la proliferación, supervivencia, apoptosis u otras señales en condiciones fisiológicas, sino que su desregulación se ha visto implicada ampliamente en el cáncer.

5.2.1. Kinasa regulada por señales extracelulares: ERK.

La proteína ERK tiene un papel ampliamente descrito en el desarrollo del cáncer a través de la señalización vía Ras-Raf-MEK-ERK y promueve la proliferación celular y la metástasis. Se ha visto que mutaciones en KRAS (G12D) y BRAF (V600E) contribuyen a una activación constante tanto de la ruta RAF-MEK-ERK como PI3K-AKT-mTOR, promoviendo activamente el desarrollo del cáncer de colon y cáncer de mama, leucemia y melanoma (Das Thakur and Stuart, 2014; Diaz-Flores et al., 2013; Ma et al., 2017). Debido a la cooperación existente entre ambas rutas a través de la activación de ERK por PI3K, en los últimos años se han buscado inhibidores específicos para bloquear ambas rutas y desarrollarlos en el tratamiento contra el cáncer (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). En melanomas se han identificado mutaciones de ganancia de función en *MEK1* y *MEK2* que provocan una continua activación de ERK y una mayor resistencia a inhibidores de MEK (Nikolaev et al., 2011).

5.2.2. Kinasas inducidas por estrés: JNK y p38.

La expresión alterada de las proteínas JNK y p38 aparece en diversos tipos de tumores humanos y líneas celulares de cáncer. Sin embargo, ambas proteínas juegan un papel dual, oncogénico o supresor tumoral, en función del tipo de tumor, contexto celular o estadio de la enfermedad.

El papel oncogénico de JNK se ha visto, por ejemplo, en células de carcinoma hepatocelular donde el incremento en la actividad kinasa de JNK1 se asocia a una mayor proliferación celular y un aumento de tumores (Hui et al., 2008). Al contrario, el papel de JNK como supresor de tumores se puede ver en tumores cerebrales donde la mutación y pérdida de función de JNK3 promueve el proceso de tumorigénesis (Yoshida et al., 2001).

La función pro-tumoral de p38 está asociada a una mayor tumorigénesis a través del control negativo de la autofagia y positivo de la supervivencia (Comes et al., 2007; Gauthier et al., 2005). Por

un lado, la inhibición de p38 provoca una reducción de la metástasis en modelos tumorales de cáncer de mama en ratones (Suarez-Cuervo et al., 2004). Mientras que por otro lado, la función de p38 como supresor de tumores ocurre de manera directa a través de la regulación negativa de la proliferación celular y la inflamación, o indirecta inhibiendo la tumorigénesis a través de la inducción de senescencia por la activación de oncogenes como p53 (Han and Sun, 2007; Thornton and Rincon, 2009).

5.3. p38 en el cáncer colorrectal.

El papel dual de p38 también se ha descrito en el CCR. Su inactivación en los enterocitos del epitelio colónico promueve la formación de tumores (Wakeman et al., 2012). En el mismo sentido, el estudio de pólipos adenomatosos en el colon de pacientes muestra una baja expresión de p38 en las células tumorales epiteliales y una fuerte expresión de dicha proteína fosforilada principalmente en macrófagos situados en el estroma tumoral (Hardwick et al., 2001). *In vitro*, la activación de p38 resulta en una inhibición de la proliferación, crecimiento y capacidad invasiva en células epiteliales derivadas de carcinoma de colon humano (Wang and Chakrabarty, 2003).

El papel de p38 como promotor tumoral en ratones está asociado a que la ausencia de expresión de p38 en las células tumorales del colon que conduce a un menor desarrollo de tumores (Gupta et al., 2014). También se ha visto que la inhibición conjunta de p38 y ERK en ratones *APC^{min}* inyectados con el carcinógeno AOM genera tumores más pequeños (Chiacchiera et al., 2012). Además, el papel oncogénico de p38 se relaciona con metástasis debido a que la menor actividad de p38 en las células tumorales del colon facilita la colonización del pulmón y el establecimiento de metástasis en hígado (Urosevic et al., 2014)

5.4. Estrés fisiopatológicos asociados a la activación de p38.

La presencia o ausencia de suero es considerado un factor importante desencadenante de la señalización por las MAPK. Por un lado, el tratamiento con suero induce la fosforilación rápida tanto de p38 como de su activador MKK3/6 y activa la transcripción de genes implicados en la proliferación celular (Buzzi et al., 2009). En el mismo sentido, la ausencia de suero regula negativamente p38 provocando una mayor adhesión y una menor migración celular (Zuluaga et al., 2007).

El estrés osmótico tiene un papel dual en la regulación de p38 y por tanto, genera respuestas diferentes en función del tipo celular. En células renales se ha visto como la hiperosmosis por cloruro sódico induce la fosforilación de p38 (Cheng et al., 2000). En otros casos, la respuesta al choque

osmótico provoca una menor proliferación celular debido a la acción de p38 como regulador negativo del ciclo celular (Casanovas et al., 2000). También, se ha descrito como la activación de ERK por hiperosmolaridad controla la acción dual de p38 en respuesta a dicho estrés (Kultz et al., 1998).

La pérdida de la inhibición de la proliferación por contacto celular se ha descrito como una característica de las células transformadas (Abercrombie, 1979). En fibroblastos, la confluencia celular induce la fosforilación y actividad de p38, provocando una parada del ciclo celular (Faust et al., 2005). Del mismo modo, en células epiteliales renales de ratón se demostró que la activación de p38 conlleva la detención del ciclo celular (Smeeton et al., 2010).

El estrés genotóxico corresponde con el daño al ADN celular, donde los compuestos químicos inductores de este estrés activan, entre otras, la cascada de las MAPK provocando una amplia variedad de respuestas celulares (Holbrook and Fornace, 1991). En el tratamiento contra el cáncer ha sido un objetivo constante en el desarrollo de compuestos eficientes en la inhibición de las kinasas para su uso en terapia simple o combinada con la quimioterapia (Waters and Cunningham, 2001). En consecuencia, se ha estudiado la inhibición de p38 en el tratamiento del CCR junto a otros quimioterapéuticos. Por ejemplo, la inhibición de p38 en cooperación con el cisplatino o el 5-fluorouracilo promueve una mayor reducción del tamaño y la malignidad de los tumores (Pereira et al., 2013; Yang et al., 2011).

6. Fosfatasas duales (DUSP).

El tipo de respuesta biológica dependiente de las MAPK depende de un equilibrio entre kinasas activadoras y fosfatasas inhibitoras (Keyse, 2000). La inactivación de las proteínas MAPK se da por la desfosforilación de los residuos conservados en el motivo Thr-X-Tyr (Camps et al., 2000). En el genoma humano se han catalogado 174 proteínas con actividad fosfatasa que se dividen en 5 grandes familias: fosfatasas Ser/Thr específicas (PTSTP), fosfatasas de proteínas Tyr (PTP), proteínas Ser/Thr como fosfatasas (PSTPL) y las fosfatasas duales (Thr/Tyr) específicas de las MAPK (DUSP) (Kabir et al., 2013).

La familia DUSP está integrada en el genoma humano por 65 genes que transcriben para un amplio grupo de proteínas que se clasifican en diferentes subfamilias en función de su estructura, sustrato y localización celular (Alonso et al., 2004). La familia incluye un grupo de 16 fosfatasas relacionadas filogenéticamente pero consideradas “atípicas” por tener diferentes sustratos o funciones fisiológicas. Sin embargo, solamente 10 miembros de la familia DUSP poseen actividad catalítica en mamíferos, a los que también se les denomina fosfatasas de las MAP kinasas (MKP) (Patterson et al.,

2009). Este último grupo activo de proteínas comparten una estructura común con un dominio de unión no-catalítico (DU) en N-terminal, un lugar homólogo a la proteína de ciclo Cdc25 y un dominio catalítico (DC) en C-terminal que contiene la secuencia consenso de las PTP (HCXXGXXR(S/T)) con el sitio fosfatasa activo (Owens and Keyse, 2007). El dominio N-terminal de la proteína tiene una función reguladora debido a que posee un sitio de reconocimiento de las diferentes isoformas de MAPK. Además, las proteínas DUSP presentan otras secuencias que determinan la localización subcelular de dichas fosfatasas. Todas estas características implican de manera diferencial a las fosfatasas DUSP en procesos como desarrollo embrionario, respuesta inmune, homeostasis metabólica y en respuesta al estrés celular (Dickinson and Keyse, 2006).

Como consecuencia de su estructura, su preferencia de sustrato y su localización celular, las 10 proteínas DUSP identificadas en mamíferos se clasifican en tres subfamilias. La primera subfamilia está compuesta por DUSP1 (MKP-1), DUSP4 (MKP-2) y DUSP5 que se sintetizan a partir de cuatro exones altamente conservados. Se activan por estrés y factores mitogénicos, y se localizan preferentemente en el núcleo. La segunda subfamilia se compone por DUSP6 (MKP-3), DUSP7 (MKP-X) y DUSP9 (MKP-4) y son sintetizadas por tres exones, siendo fosfatasas citoplásmicas y específicas de ERK. Finalmente, el tercer grupo está formado por DUSP8 (M3/6), DUSP10 (MKP-5) y DUSP16 (MKP-7), sintetizadas por 6 exones, localizadas tanto en el núcleo como el citoplasma y son específicas de JNK y p38 (Theodosiou and Ashworth, 2002).

DUSP	Subgrupo	Otros nombres	Ortólogos	Localización cromosómica	Localización subcelular
DUSP1	I	hVH1/CLI00	MKP-1/3CH134 (m)	5q35	Nuclear
DUSP2	I	hPAC-1	—	2p11.2-2q11	Nuclear
DUSP4	I	hVH2/TYP1	MKP-2 (r)	8p12-p11	Nuclear
DUSP5	I	hVH3/B23	Cpg21 (r)	10q25	Nuclear
DUSP6	II	PYST1	MKP-3/rVH6 (r)	12q22-q23	Citosólico
DUSP7	II	PYST2/B59	MKP-X (r)	3p21	Citosólico
DUSP8	III	hVH5	M3/6 (m)	11p15.5	Nuclear / Citosólico
DUSP9	II	MKP-4	—	Xq28	Nuclear / Citosólico
DUSP10	III	MKP-5	—	1q32	Nuclear / Citosólico
DUSP16	III	MKP-7	MKP-M (m)	12p12	Citosólico

Figura 1-5. Principales proteínas de la familia de DUSP. Clasificación y localización cromosómica y subcelular de las 10 fosfatasas con actividad catalítica de la familia DUSP. Las DUSP se clasifican en tres grupos (I, II, III). Los nombres alternativos corresponden a humanos y los ortólogos hacen referencia a ratón (m) o rata (r). Tabla modificada de (Theodosiou and Ashworth, 2002).

6.1. Fosfatasa dual específica 10 de las MAPK.

La fosfatasa dual específica 10 de las MAPK (DUSP10) o fosfatasa 5 de las MAP kinasas (MKP5) fue identificada dentro de la familia DUSP como una fosfatasa específica de las MAPK activadas por estrés. El gen *DUSP10* está situado en el cromosoma 1q32 y genera dos transcritos de 3.4 y 2.4 Kb que se expresan en los diferentes tejidos. Únicamente uno de los transcritos de DUSP10 codifica para una proteína de 482 aa con un peso molecular de 52 kDa aproximadamente. En células de mamíferos, DUSP10 desfosforila de manera selectiva a p38 y JNK, mientras que de manera no selectiva regula ERK. (Theodosiou et al., 1999). DUSP10 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, aunque se encuentra más concentrado en la cara citoplásmica de la membrana nuclear. La expresión de DUSP10 se detecta basalmente en corazón, pulmón, músculo esquelético y riñón (Tanoue et al., 1999).

La proteína DUSP10 conserva la estructura del DU en la región N-terminal y del DC en la región C-terminal al igual que el resto de DUSP, pero posee diferencias que la caracterizan. Esta fosfatasa tiene el DU conservado *D-box* (REGKEPLVL) del tipo α -hélice que media la unión a JNK y a ERK en la parte N-terminal y no en el C-terminal como el resto de fosfatasa de la familia. Por otra parte, el DC de DUSP10 tiene una conformación activa, inexistente en el resto de fosfatasa, que explica la actividad constitutiva de DUSP10 (Tao and Tong, 2007). La preferencia de esta fosfatasa por el sustrato p38 se ha demostrado a través de la existencia de dos regiones en hélice localizadas en el DU de MAPK situado en DUSP10 que se anclan al sitio de unión de p38 α , comprometiendo su sitio activo (Zhang et al., 2011).

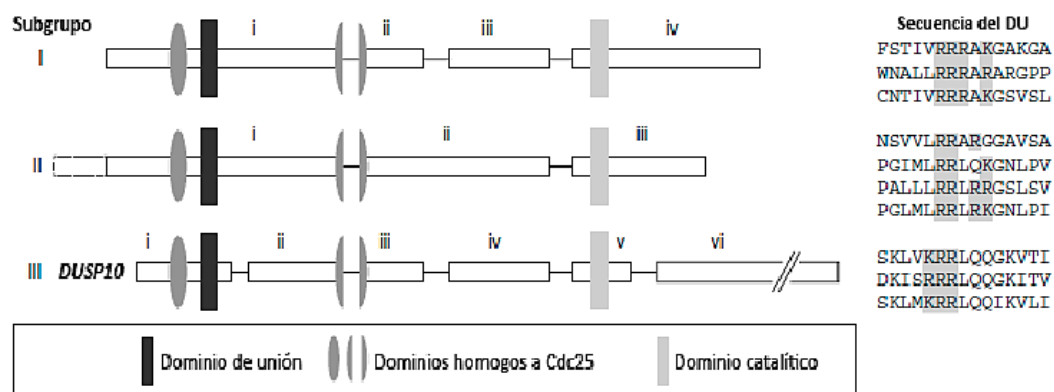


Figura I-6. Estructura génica y proteica de los tres subgrupos de DUSP. Hay tres tipos de estructuras génicas en función del número de exones: cuatro exones para el grupo I, tres exones para el grupo II y seis exones para el grupo III. Los motivos estructurales de la proteína se presentan en los tres grupos, pero el subgrupo III al que pertenece DUSP10 tiene una secuencia y localización de aminoácidos en el dominio de unión (DU) diferente al resto de fosfatasa, proporcionando la unión específica a sus sustratos. Esquema modificado de (Theodosiou and Ashworth, 2002).

Ciertas DUSP son inducibles, mientras que otras son estabilizadas o desestabilizadas por fosforilación. DUSP10 es preferentemente regulada y estabilizada de distintas maneras y por diferentes proteínas. Por un lado, la fosforilación de los residuos Ser224 y Ser230 de DUSP10 por la actividad de la kinasa mTORC2 estabiliza la fosfatasa, resultando en una constante inactivación de p38 (Benavides-Serrato et al., 2014). De otra manera, la expresión de DUSP10 puede ser regulada por las MAPK provocando una retroalimentación negativa entre la actividad de las kinasas y la fosfatasa (Taxman et al., 2011). Al mismo tiempo, se ha descrito como la expresión de DUSP10 puede ser regulada a través de *microRNA* (miRNA) como miR-181 y miR-92a, los cuales se unen al extremo 3'UTR de manera directa y específica de la secuencia de la fosfatasa. La expresión de miR-181 altera la migración de las células humanas de carcinoma hepatocelular a través de la fosforilación de p38, mientras que la presencia de miR-92a afecta la proliferación de las células de cáncer pancreático mediante la regulación de JNK (He et al., 2014; Song et al., 2013).

6.2. DUSP10 en la regulación de JNK y p38 en la fisiopatología tisular.

La expresión de DUSP10 está implicada en el control fisiológico de algunos tejidos al regular principalmente JNK y p38. En ratones, se ha visto como DUSP10 está implicado en la diferenciación de los adipocitos pardos a través de la regulación de los niveles de fosforilación de p38 (Choi et al., 2013). En modelos de ratones con distrofia muscular, DUSP10 disminuye la proliferación celular y la miogénesis debido a la desfosforilación específica de p38 y JNK (Shi et al., 2013). También, se ha visto como DUSP10 controla la homeostasis del epitelio del colon mediante la desfosforilación de JNK y la menor producción de la proteína mucina MUC2, resultando en un aumento de la diferenciación celular y una disminución en la proliferación y apoptosis (Wang et al., 2014).

El uso de ratones *MKP5^{-/-}* permitió relacionar por primera vez la expresión de DUSP10 con la regulación de la respuesta inmune. En este sentido, DUSP10 evita la completa respuesta inmune adaptativa e innata debido a una reducción en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como resultado de la regulación negativa que ejerce sobre JNK y factores transcripciones como AP1 en células inmunes (Zhang et al., 2004). Del mismo modo, la expresión de DUSP10 está implicada en el control de la inflamación vascular mediada por neutrófilos, en la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos tras la infección del tejido pulmonar y en el tejido adiposo asociado a obesidad o resistencia a la insulina (Qian et al., 2009; Qian et al., 2012; Zhang et al., 2015b). Por el contrario, la ausencia de DUSP10 protege contra infecciones como la malaria a través de un incremento de interferón- γ (IFN γ) mediado por linfocitos T y células dendríticas en la fase aguda de la infección

(Cheng et al., 2014). El papel de DUSP10 en el control de la respuesta inflamatoria mediada por INF γ se debe a la capacidad de esta fosfatasa de unirse y desfosforilar al factor 3 regulador de IFN γ (IRF3) (James et al., 2015).

6.3. Papel de DUSP10 en el cáncer colorrectal.

Las proteínas de la familia DUSP están desreguladas en diferentes cánceres humanos, sin embargo, no está clara su contribución con el fenotipo maligno durante el desarrollo tumoral (Bermudez et al., 2010). El papel de DUSP10 está poco estudiado en cáncer. En meningiomas de pacientes se ha detectado una alta expresión de DUSP10 asociada a una regulación negativa de p38 que promueve el desarrollo de los tumores debido, posiblemente, a una reducción en la apoptosis (Johnson et al., 2016). En cáncer de mama, DUSP10 se ha identificado como un regulador de p53 a través de la desfosforilación de p38, promoviendo el desarrollo tumoral (Hrstka et al., 2015).

En los últimos años, se han identificado 9 polimorfismos (tSNP) para el gen DUSP10, de los cuales sólo 3 se han asociado con un menor riesgo de CCR (Duan et al., 2015). También, se conoce que DUSP10 se encuentra específicamente sobre-regulado en los tejidos humanos de cáncer de colon y se ha propuesto que podría estar actuando como proteína de soporte ("*scaffold*") regulando negativamente a la proteína ERK (Nomura et al., 2012). Del mismo modo, DUSP10 se relaciona con una peor recuperación del epitelio colónico tras un proceso de inflamación asociado al tratamiento con DSS en ratones, mediante la regulación negativa de ERK y la inhibición de la expresión de KLF5 (Png et al., 2016).

7. Ruta Hippo.

La ruta Hippo es una vía de señalización del crecimiento celular que se encuentra conservada en la evolución animal. En *Drosophila*, la ruta Hippo a través de la proteína *Yorkie* (Yki) fue identificada como la principal proteína reguladora del control del tamaño de los órganos, donde su desregulación conduce a la tumorigénesis (Dong et al., 2007). En 1994, se identificó por primera vez la Proteína Asociada a Yes (YAP) como proteína homóloga a Yki en mamíferos (Sudol, 1994). YAP es la principal proteína de la ruta Hippo y está implicada en regular respuestas celulares como apoptosis y proliferación mediante su activación por desfosforilación (Huang et al., 2005). Asociado a YAP se encuentra el co-activador TAZ, un parólogo de YAP en vertebrados, y descrito como una proteínas 14-3-3 de unión (Kanai et al., 2000). YAP necesita de su unión a TAZ en el citoplasma para formar un

complejo co-transcripcional que, asociado a los factores de transcripción TEAD en el núcleo, activan la transcripción génica (Vassilev et al., 2001).

7.1. Señalización a través de YAP.

Cuando la ruta Hippo esta inactiva, la proteína YAP se encuentra activa, desfosforilada y es capaz de translocar al núcleo. La acumulación de YAP en el núcleo de las células es determinante en funciones como el crecimiento de los órganos y tejidos, sensor de contacto celular, desarrollo embrionario y en la arquitectura de los epitelios (Piccolo et al., 2014). Sin embargo, la presencia de YAP en el núcleo no corresponde siempre con la proteína activa. Esto se debe a que la presencia de YAP fosforilada en el residuo Ser127 en este compartimento subcelular (Wada et al., 2011). Además, el uso de inhibidores de la exportación nuclear como leptomycina B muestra una acumulación de YAP fosforilado en el núcleo (Ren et al., 2010).

También, se ha descrito como la señalización de YAP puede regularse a través de la activación/inactivación de los residuos Ser/Tyr por interacciones físicas con otras proteínas o por la acción de determinados compuestos. Por un lado, YAP puede ser re-activada, tras encontrarse fosforilada e inactiva, por la acción de la actividad de fosfatasas como PP1 (Wang et al., 2011). Por otro lado, la señalización de YAP puede ser inhibida, evitando la formación de los complejos YAP-TEAD, mediante el diseño de péptidos análogos a YAP o drogas farmacológicas (Wang et al., 2016; Zhou et al., 2015). Igualmente, la interacción física de la proteína PTPN14 con YAP, formando un complejo, promueve la retención de esta última en el citoplasma (Wang et al., 2012).

7.2. Regulación de YAP a través de la señalización de Hippo.

La ruta Hippo puede ser regulada a través de una señalización definida como “canónica” o “no-canónica” en función de las proteínas que participan. La ruta “canónica” se centra en la regulación de YAP a través de la activación de las kinasas dependientes de LATS. La ruta “no-canónica” agrupa todas las señales independientes de LATS que son capaces de regular la activación de YAP (Ehmer and Sage, 2016).

7.2.1. Ruta “canónica” o dependiente de LATS.

La activación de la ruta Hippo por la vía “canónica” conlleva la activación de las kinasas MST1/2 que unida a su regulador SAV1 forma un complejo capaz de activar por fosforilación las kinasas LATS1/2 (Chan et al., 2005). Del mismo modo, MST1/2 es capaz de activar a la proteína reguladora de

LATS1/2, MOV1A/B (Praskova et al., 2008). El complejo LATS1/2-MOV1A/B fosforila e inactiva tanto a YAP como a TAZ, señalizando para que sean retenidas en el citoplasma, expulsadas del núcleo y/o degradadas por el proteasoma (Lei et al., 2008; Zhao et al., 2007). YAP puede ser fosforilado en los residuos Ser/Thr de los motivos consenso HXRXXS en 5 sitios diferentes por LATS1/2, regulando la estabilidad y localización de la proteína. Entre los residuos descritos, se ha identificado la fosforilación de la Ser127 como la señal de retención de YAP en el citoplasma debido a que se localiza en el motivo situado en el sitio de unión de las proteínas 14-3-3 (Basu et al., 2003). Sin embargo, los residuos Ser381 y Ser384 se han descrito como fosforilaciones marcadoras de degradación por el proteasoma (Zhao et al., 2010).

7.2.2. Ruta “no-canónica” o independiente de LATS.

La regulación de YAP puede darse de manera independiente a LATS1/2. Se ha visto como otras quinasas como AKT, JNK y NDR son capaces de fosforilar YAP en los residuos Ser y promover la apoptosis celular (Basu et al., 2003; Danovi et al., 2008; Zhang et al., 2015a). Del mismo modo, el residuo Tyr357 de YAP puede fosforilarse por quinasas como Yes y c-Abl, lo que conlleva a promover la tumorigénesis (Levy et al., 2008; Rosenbluh et al., 2012).

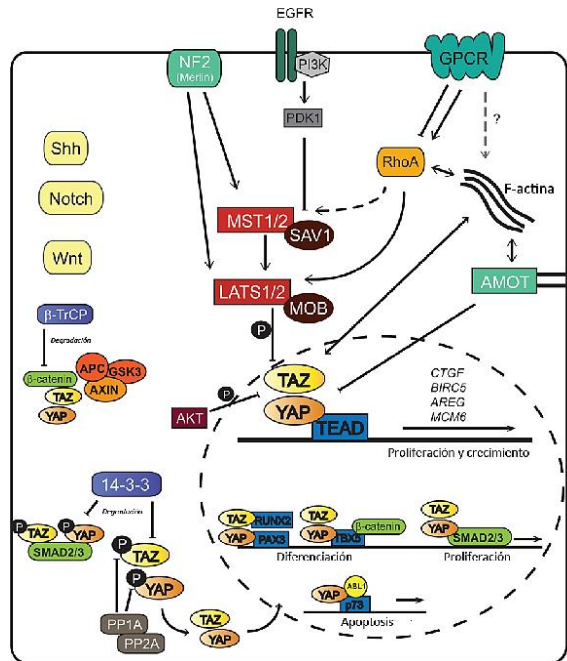


Figura I-7. Principales componentes de la ruta Hippo “canónica” y “no-canónica”. Regulación transcripcional de los co-factores YAP y TAZ en células de mamíferos por medio de la ruta “canónica” o dependiente de LATS y la ruta “no-canónica” o independiente de LATS. Su actividad, a través de diversos factores de transcripción, regula la expresión de genes implicados en proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis. Diversos tipos de proteínas regulan a YAP por fosforilación o desfosforilación promoviendo su retención en el citoplasma o su actividad transcripcional en el núcleo, respectivamente. Imagen modificada de (Ehmer and Sage, 2016).

7.3. Respuesta de YAP a la densidad celular.

La inhibición de la proliferación por contacto (IPC) es un mecanismo indispensable en el desarrollo de órganos y tejidos. Cuando la IPC se encuentra desregulada, como en el caso del cáncer, promueve la transformación celular y la progresión tumoral (Abercrombie, 1979). La ruta Hippo ha sido implicada en la IPC a través de la activación y localización celular de YAP (Low et al., 2014). Se ha descrito que durante la proliferación celular YAP permanece en el núcleo, mientras que al aumentar la densidad y las células llegar al contacto, la proteína YAP se mantiene inactiva y localizada en el citoplasma (Zhao et al., 2007).

Las diversas señales que afectan la actividad de YAP, directa o indirectamente a través de LATS, abarcan desde moduladores del citoesqueleto como la matriz extracelular, la polaridad de las células, los contactos célula-célula o la organización de la proteína F-actina, hasta la señalización a través de la activación de los receptores EGFR y GPCR, y de las rutas Wnt y TGF β , pasando por estreses como el daño en el ADN, la hipoxia y la privación de suero (Bae et al., 2017).

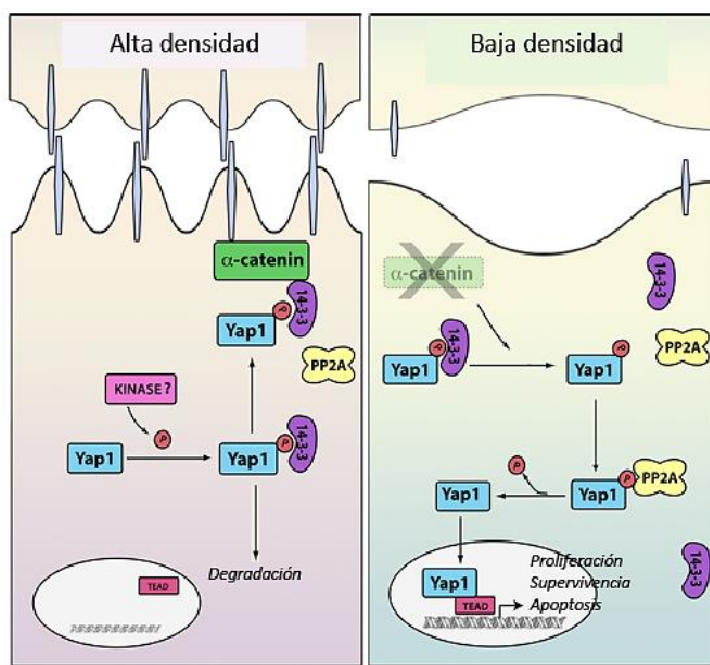


Figura I-8. Regulación de YAP por el contacto celular. En células en alta densidad, YAP se encuentra desfosforilado pudiendo permanecer en el citoplasma unido a proteínas de membrana o señalizando para su degradación. En células en baja densidad, YAP es desfosforilada por fosfatasas como PP2A permitiendo pasar al núcleo, actuar como co-factor de transcripción y activar genes implicados en proliferación, supervivencia y control de la apoptosis. Imagen modificada de (Schlegelmilch et al., 2011).

OBJETIVOS

A lo largo de los años, se ha descrito ampliamente el papel de la enzima COX2 en el desarrollo del CCR, bien directamente o a través de su actividad pro-inflamatoria, haciendo de ella una diana terapéutica importante y objeto de multitud de estudios de investigación en la clínica. Sin embargo, los efectos secundarios adversos a nivel sistémico producidos por el tratamiento prolongado con inhibidores farmacológicos de COX2, hace necesaria la búsqueda de genes inducibles por dicha proteína que medien los efectos pro-neoplásicos de COX2 y cuya inhibición no presente los efectos secundarios negativos de la inhibición de dicha enzima.

Quisimos contribuir en la búsqueda de esos nuevos genes e identificamos a DUSP10. En consecuencia, esta tesis doctoral tiene el objetivo general de estudiar el papel de DUSP10 como una posible enzima efectora de la actividad pro-neoplásica de COX2 y PGE₂. DUSP10 es una fosfatasa que regula negativa y selectivamente por desfosforilación a JNK y p38 MAPK, proteínas implicadas en proliferación, supervivencia, apoptosis, metástasis y angiogénesis e inducibles por múltiples estreses. Nos propusimos investigar el posible papel pro-tumoral de DUSP10 en el desarrollo del CCR y en la regulación de la respuesta a estreses orquestados por JNK y p38 MAPK, planteándonos los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar genes regulados por NFAT, cuya expresión se ve modificada por la sobreexpresión de COX2 y CaN, y su regulación por PG en líneas celulares de CCR.
2. Analizar la regulación de la expresión de DUSP10 en el CCR.
3. Analizar el efecto de DUSP10 en el fenotipo *in vitro* de células de CCR y su mecanismo de acción.
4. Estudiar la acción de DUSP10 en el desarrollo tumoral *in vivo* en xenoinjertos de células de CCR en ratones inmunodeprimidos y en tumores inducidos por AOM/DSS.
5. Analizar la expresión de DUSP10 en muestras de pacientes con cáncer de colon y su relación con la supervivencia, además de su implicación en enfermedades inflamatorias intestinales.
6. Analizar los efectos de DUSP10 en la respuesta determinados estreses fisiopatológicos (genotoxicidad, estrés osmótico o privación de suero).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales.

1.1. Líneas y cultivos celulares.

La línea celular HT29 (células epiteliales de adenocarcinoma de colon humano) se obtuvo de la ATCC® (*LGC Standards*, Barcelona, España). Las líneas CACO2 (células epiteliales de adenocarcinoma de colon humano) y HCT116 (células epiteliales de carcinoma de colon humano) se obtuvieron del Banco de células del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid, España). Las líneas SW480 (células de carcinoma de colon) y SW620 (células de carcinoma de colon derivadas de metástasis) fueron cedidas amablemente por el Dr. Alberto Muñoz (Palmer et al., 2001) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB, Madrid, España). Las líneas 3T3-FT (fibroblastos embrionarios de ratón transformados), MEF-L1 (línea celular primaria de fibroblastos embrionarios de ratón) y HEK-293T (células epiteliales humanas de riñón) estaban disponibles en el *Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'* (CBMSO, Madrid, España). La línea HT29-lucD6 (*Xenogen Corporation*) expresa constitutivamente el gen de la luciferasa. Dicha expresión se mantuvo estable gracias a la adición regular de 200 µg/ml del antibiótico G418.

Los cultivos celulares se crecieron en medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) con un 5% de suero fetal bovino (FBS), excepto CACO2 y 3T3 que se crecieron en un 10% de FBS. Todos los cultivos fueron suplementados con aminoácidos no esenciales, 0.01% de piruvato sódico, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El medio de cultivo se cambió cada 48 h y los pases se realizaron levantando las células por tripsinización (EDTA-Tripsina) previo lavado con PBS estéril. Todos los compuestos y medios de cultivo fueron suministrados por el *Servicio de Cultivos* del CBMSO, a excepción del FBS que fue adquirido de las casas comerciales Gibco y Biowest. Los cultivos en monocapa se mantuvieron en un incubador bajo condiciones controladas de temperatura (37°C) y atmósfera humificada (97%) con un 5% de CO₂.

Todo el material de plástico utilizado para el desarrollo de la experimentación y mantenimiento de los cultivos celulares se suministró por *Falcon* (Beckton Dickinson) y *Corning* (Corning Inc.).

1.2. Plásmidos de expresión.

- **pCR®II.-** vector de clonaje con un reportero *LacZ* y expresión de genes de resistencia a ampicilina y kanamicina para su selección en bacterias (Invitrogen).

- **pRSV-Rev.-** vector portador de la secuencia de la enzima transcriptasa inversa viral (disponible en el laboratorio).
- **pCMV-Vsvg.-** vector con la secuencia para generar la envoltura viral (disponible en el laboratorio).
- **pCgpV.-** vector de la secuencias de las proteínas de empaquetamiento viral (disponible en el laboratorio).
- **pSMPUW-IRES-Bsd.-** vector lentiviral de expresión bicistónica que contiene el gen de resistencia a blasticidina (VPK-219, *Cell Biolabs*), donde se clonaron las secuencias de COX2 y ACN.
- **pLenti-KO.1-Puro.-** vector plasmídico lentiviral portador del gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y gen de resistencia a puromicina para su selección en células de mamíferos (disponible en el laboratorio). Además, fue utilizado para insertar la secuencia específica de *shRNA* (MISSION, Sigma) para silenciar DUSP10 (**Tabla M-1**).
- **pLenti-CMV/TO-Hygro.-** vector lentiviral portador gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias, gen de resistencia a higromicina B para su selección en células de mamíferos. Se utilizó para expresar la secuencia específica del gen DUSP10 humano (OriGene Thechnologies) (**Tabla M-2**).

Código	Secuencia	Nombre
TRCN0000001885	5'CCGGCAATGAACCAAGCCGAGTGATCTCGAGATCACTCGGCTTGGTTTCATTGTTTT3'	shDUSP10 (A)
TRCN0000001886	5'CCGGCAAAGGCAAACGACCAATTATCTCGAGATAATTGGTCGTTTGCCTTTGTTTT3'	shDUSP10 (B)
TRCN0000001887	5'CCGGGTGTTTCTGTTGATTGTGTAACCTCGAGTTACACAATCAACAGAAACACTTTT3'	shDUSP10 (C)
TRCN0000001888	5'CCGGCAGGCTCTTAAGTCATCAACTCGAGTTGATGGACTTAGAGAGCCTGTTTT3'	shDUSP10 (D)
TRCN0000001889	5'CCGGCCACTATGAGAAAGGCCTGTTCTCGAGAACAGGCCTTTCATAGTGGTTTT3'	shDUSP10 (E)

Tabla M-1. Secuencias de nucleótidos de los shRNA utilizados para silenciar DUSP10. En verde se observa la secuencia sentido, en azul la secuencia antisentido y en negro los nucleótidos que forman el bucle.

Código	Cebadores	Secuencia	Nombre
SC31766	Sentido	5' GTG GAT CCA TGC CTC CGT CTC CTT TAG 3'	DUSP10
	Antisentido	5' CAC TCT AGA TTC ACA CAA CCG TCT CCA C 3'	

Tabla M-2. Secuencia de los cebadores para la amplificación del ADNc de DUSP10. La secuencia de DUSP10 se encuentra clonada en el vector plasmídico pCRII y contiene sitios de restricción para las enzimas BamHI (rojo) y XbaI (azul).

1.3. Soluciones.

Nombre	Composición
<i>TAE</i>	40 mM Trizma base, 20 mM ac.acético y 1 mM EDTA pH 8
<i>PBS/PBS-T</i>	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na ₃ PO ₄ y 1.5 mM K ₂ HPO ₄ / más 0.1% Tween20 (v/v)
<i>TBS/TBS-T</i>	20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 137mM NaCl / más 0.05% Tween20 (v/v)
<i>Solución bloqueo</i>	TBS-T o PBS-T más 5% BSA
<i>Solución lisis de proteínas</i>	1% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.1% SDS y 0.1% DOC
<i>Solución lisis IP</i>	50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% tritón X100 (v/v)
<i>Solución electroforesis 10x</i>	125 mM Tris-glicina, 25 mM Trizma Base y 0.1% SDS pH 8.3,
<i>Solución transferencia 10x</i>	25 mM Tris-HCl pH 8.3 y 192 mM Glicina. Al uso se añade 20% metanol
<i>Sol. separadora (SDS-PAGE)</i>	1.5 M Tris-HCl pH 8.8 y 0.4% SDS
<i>Sol. concentradora (SDS-PAGE)</i>	0.4 M Tris-HCl pH 6.8 y 0.4% SDS
<i>Tampón A</i>	10 mM HEPES pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA y 0.1mM EGTA
<i>Tampón C</i>	20 mM HEPES pH 7.6, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA y 1 mM EGTA
<i>Tampón de ruptura</i>	2% SDS, 10% glicerol, 64.5 mM Tris-HCl pH6.8, 5% 2-mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol
<i>Cristal violeta</i>	50% H ₂ Od-metanol y 0.5% cristal violeta (p/v)
<i>Tampón sodio-citrato</i>	0.01 M Tri-sodium citrato dihidrato pH 6
<i>Solución ác.cítrico</i>	0.1 M ac. cítrico

Tabla M-3. Conjunto de soluciones y tampones preparados en el laboratorio.

1.4. Reactivos.

Compuesto	Origen	Referencia	Descripción
<i>A231787</i>	Sigma-Aldrich	C7522	Ionóforo de calcio
<i>Ácido acetilsalicílico</i>	Sigma-Aldrich	A5376	Inhibidor de ciclooxigenasas
<i>Ácido cítrico</i>	Sigma-Aldrich	C83155	Tampón de desenmascaramiento
<i>Acrilamida</i>	Bio-Rad	161-0107	Compuesto orgánico de amida
<i>Agar bacteriológico</i>	Conda	1800.00	Preparación de placas LB agar
<i>Agarosa D1 Low EEO</i>	Conda	8010.00	Preparación de geles agarosa
<i>Agua oxigenada</i>	Foret	-	Bloqueo peroxidasa endógena
<i>AH6809</i>	Sigma-Aldrich	A1221	Antagonista de los receptor EP1/2/3 y DP
<i>AH23848</i>	Cayman Chemical	19023	Antagonista del receptor EP4 y TP
<i>AL8816</i>	Cayman Chemical	16735	Antagonista del receptor FP
<i>AlamarBlue®</i>	AbD serotec	BUF012A	Indicador fluorescente de actividad mitocondrial
<i>Ampicilina</i>	Sigma-Aldrich	A5354	Antibiótico de selección
<i>AOM</i>	Sigma-Aldrich	A5486	Carcinógeno inductor de tumores
<i>Bis-acrilamida</i>	Bio-Rad	161-0201	Agente entrelazador de geles
<i>Blasticidina</i>	Invitrogen	R210-01	Antibiótico de selección
<i>Bromuro de hexadimetrina</i>	Sigma-Aldrich	107689	Polication para transducciones virales
<i>BSA</i>	Sigma-Aldrich	A7906	Albúmina de suero bovino
<i>Camptotecina</i>	Sigma-Aldrich	9911	Inhibidor de topoisomerasa I

<i>Celecoxib</i>	Esteve	ARTILOG®	Inhibidor de ciclooxigenasa-2
<i>Ciclosporina A</i>	Calbiochem	239835	Inhibidor de calcineurina
<i>Cisplatino</i>	Sigma-Aldrich	P4394	Intercalante de ADN
<i>cOmplete-EDTA free</i>	Roche	11873580001	Cóctel de inhibidores de proteasas
<i>Cristal violeta</i>	Sigma-Aldrich	C6158	Tinción de células
<i>DAB+Cromógeno</i>	Dako	K3467	Sustrato cromogénico de peroxidasa
<i>DAPI</i>	Merck Millipore	268298	Marcador de ADN
<i>DMSO</i>	Sigma-Aldrich	D-5879	Disolvente
<i>DSS</i>	AppliChem	A3261	Compuesto irritante intestinal
<i>Erlotinib</i>	Esteve Lab.		Inhibidor específico de EGFR
<i>Entellan New</i>	Merck Millipore	1.079161.010 0	Medio de montaje
<i>Etanol</i>	Sigma-Aldrich		Varios
<i>Eterocoxib</i>	MSD	656534.6	Inhibidor de la ciclooxigenasa
<i>Eukitt®</i>	Fluka Analytical	03989	Medio de montaje
<i>Faloidina-Alexa 647</i>	Thermo Scientific	A22287	Marcaje de F-actina
<i>FBS</i>	Gibco Biowest	10500064 S1820	Suero fetal bovino para cultivo celular
<i>5-Fluorouracilo</i>	Sigma-Aldrich	F6627	Inhibidor de la timidina sintasa
<i>Forane®</i>	Abbott	-	Isoflurano. Anestesia gaseosa
<i>Forskolina</i>	Sigma-Aldrich	F3917	Incrementa la actividad de adenilil ciclasa
<i>G480</i>	Invivogen	ant-gn-5	Antibiótico de selección
<i>Gefitinib</i>	Esteve Lab.	-	Inhibidor de la tirosina quinasa
<i>GelRed™</i>	Biotium	41003	Tinción de ácidos nucleicos
<i>GSK-269984A</i>	Almirall	-	Antagonista receptor EP1
<i>Hematoxilina en solución de Maller</i>	Merck Millipore	1.09253	Colorante básico de tinción nuclear
<i>Higromicina B</i>	Invitrogen	10687-010	Antibiótico de selección
<i>Lipofectamine® 2000</i>	Invitrogen	11668-019	Reactivo de transfección
<i>(D)-Luciferin</i>	Promega	E1605	Sustrato para la enzima luciferasa
<i>Meltilex™ A</i>	PerkinElmer	1450-441	Cera de centelleo
<i>Metafectene® Pro</i>	Biontex	T040	Reactivo de transfección
<i>Metanol</i>	Sigma-Aldrich		Varios
<i>MF-498</i>	Almirall	-	Antagonista receptor EP4
<i>MTT</i>	Sigma-Aldrich	M5655	Indicador de actividad metabólica
<i>NaCl</i>	Merck	1.06400	Preparación de soluciones y tampones
<i>Nonidet® P40</i>	Affymetrix	19628	Surfactante no iónico
<i>OptiMEM</i>	Invitrogen	31985047	Medio de cultivo de transfección
<i>Oxaliplatin</i>	Sigma-Aldrich	O9512	Quimioterapéutico
<i>PI/RNase Staining Buffer</i>	BD Pharmingen™	550825	Tampón de ciclo celular con yoduro de propidio y RNasas
<i>PE Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	BD Pharmingen™	559763	Kit de determinación de células apoptóticas
<i>PFA</i>	Sigma-Aldrich	HT501128	Paraformaldehído. Fijador de tejido

<i>PFA-metanol free</i>	Electron Microscopy Science	15710	Paraformaldehído. Fijador de células
<i>PGE₂</i>	Cayman Chemical	14010	Prostaglandina E ₂
<i>PGF_{2α}</i>	Cayman Chemical	16010	Prostaglandina F _{2α}
<i>PhoStop™</i>	Roche	04-906845001	Coctel de inhibidores de fosfatasas
<i>Printed filtermat A</i>	PerkinElmer	1450-421	Papel de filtrado para tritio
<i>Prolong Diamond</i>	Thermo Scientific	P-36970	Medio de montaje de células fijadas
<i>Protein A/G Agarose</i>	Pierce Biotech.	20421	Bolas de agarosa (IP)
<i>Puomicina</i>	Invitrogen	A11138	Antibiótico de selección
<i>REAL™ Target Retrieval Solution</i>	Dako	S2031	Desenmascaramiento de epítomos
<i>Restore® Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Scientific	21059	Restaurador de membranas de inmunoblot
<i>SB239063</i>	Sigma-Aldrich	S0569	Inhibidor de p38
<i>Super Signal West Dura Substrate</i>	Pierce Biotech.	34076	Sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa
<i>Timidina tritiada</i>	PerkinElmer	NET027A005 MC	Incorporación de síntesis de ADN
<i>Tri-sodium citrate dihydrate</i>	Sigma-Aldrich	S1804	Preparación del tampón de desenmascaramiento de epítomos
<i>Triton™ X-100</i>	Merck	108643	Surfactante no iónico
<i>Topotecan IV</i>	Hycamtin	10000000057 353	Inhibidor de la topoisomerasa I
<i>TRizol</i>	Invitrogen	15596	Reactivo para la extracción de ARN/Proteína
<i>Tween®-20</i>	Sigma-Aldrich	P-2287	Detergente no iónico
<i>Vectastain Elite ABC Kit</i>	Vectorlabs	PK-6100	Sistema HRP para avidina/biotina
<i>Verteporfina</i>	Sigma-Aldrich	0534	Inhibidor de YAP
<i>X-Gal</i>	Sigma-Aldrich	XGAL-RO	Sustrato para β-galactosidasa
<i>Xileno</i>	AppliChem	141769.2711	Deshidratación de tejidos

Tabla M-4. Compuestos y componentes adquiridos de casas comerciales o cedidos por farmacéuticas.

1.5. Anticuerpos.

Anticuerpo (Clon)	Origen	Referencia	Característica (Uso)
<i>Actina (I-90)</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616	Policlonal (WB)
<i>AKT</i>	Cell Signaling	9272	Policlonal (WB)
<i>Anti-Mouse IgG/Alexa 488</i>	Thermo Scientific	A21121	Policlonal (IF)
<i>Anti-Mouse IgG/Alexa 594</i>	Thermo Scientific	A21203	Policlonal (IF)
<i>Anti-Mouse IgG/Biotina</i>	DakoCytomation	E-0433	Policlonal (IHQ)
<i>Anti-Mouse IgG/HRP</i>	DakoCytomation	P-0260	Policlonal (IHQ)
<i>Anti-Mouse IgG/HRP</i>	Cell Signaling	7076	Policlonal (WB)
<i>Anti-Rabbit IgG/Alexa 488</i>	Thermo Scientific	A21206	Policlonal (IF)
<i>Anti-Rabbit IgG/Alexa 594</i>	Thermo Scientific	A21207	Policlonal (IF)

<i>Anti-Rabbit IgG/Biotina</i>	DakoCytomation	E-0432	Policlonal (IHQ)
<i>Anti-Rabbit IgG/HRP</i>	Cell Signaling	7074	Policlonal (WB)
<i>Anti-Rabbit IgG/HRP</i>	DakoCytomation	P-0448	Policlonal (IHQ)
<i>Anti-Rat IgG/Biotina</i>	Vector Laboratories	BA-4001	(IHQ)
<i>CD45 (30-FII)</i>	BD Biosciences	550539	Monoclonal (IHQ)
<i>CDK2 (78B2)</i>	Cell Signaling	2546	Monoclonal (WB)
<i>CDK4 (DCS156)</i>	Cell Signaling	2906	Monoclonal (WB)
<i>CDK6 (DCS83)</i>	Cell Signaling	3136	Monoclonal (WB)
<i>COX1</i>	Sigma-Aldrich	HPA002834	Policlonal (IHQ)
<i>COX2</i>	Sigma-Aldrich	HPA001335	Policlonal (IHQ)
<i>COX2 (CX229)</i>	Cayman Chemicals	160112	(WB)
<i>Ciclina D1 (DCS6)</i>	Cell Signaling	2926	Monoclonal (WB)
<i>Ciclina D3 (DCS22)</i>	Cell Signaling	2936	Monoclonal (WB)
<i>DUSP10</i>	Abcam	ab140123	Monoclonal (IF/IHQ)
	Cell Signaling	3483	Policlonal (WB)
<i>E-cadherina (24E10)</i>	Cell Signaling	3195	Monoclonal (WB)
<i>EP1</i>	Cayman Chemicals	101740	Policlonal (WB)
<i>EP2</i>	Cayman Chemicals	101750	Policlonal (WB)
<i>EP3</i>	Cayman Chemicals	101760	Policlonal (WB)
<i>EP4</i>	Cayman Chemicals	101775	Policlonal (WB)
<i>ERK1/2 (p44/42 MAPK)</i>	Cell Signaling	9102	Policlonal (WB)
<i>GAPDH (6C5)</i>	Merk Millipore	MAB374	Monoclonal (WB)
<i>HSP90 α/8 (H-114)</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-7947	Policlonal (WB)
<i>JNK1/2/3 (FL)</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-571	Policlonal (WB)
<i>Ki67 (SP6)</i>	Abcam	ab16667	Monoclonal (IHQ)
<i>Lamin A/C (131C3)</i>	Abcam	ab8984	Monoclonal (WB)
<i>p38</i>	Cell Signaling	9212	Policlonal (WB)
<i>α-Tubulina (DM1A)</i>	Sigma-Aldrich	T6199	Monoclonal (WB)
<i>p21 Waf1/Cip1 (12D1)</i>	Cell Signaling	2947	Monoclonal (WB)
<i>p27 Kip1</i>	Cell Signaling	2552	Policlonal (WB)
<i>Phospho-AKT</i>	Cell Signaling	9271	Policlonal (WB)
<i>Phospho-ERK1/2</i>	Cell Signaling	9101	Policlonal (WB)
<i>Phospho-JNK (G-7)</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-6254	Monoclonal (WB)
<i>Phospho-p38 (3D7)</i>	Cell Signaling	9215	Monoclonal (WB/IHQ)
<i>Phospho-YAP (D9W2I)</i>	Cell Signaling	13008	Policlonal (WB)
<i>YAP (D8H1X)</i>	Cell Signaling	14074	Policlonal (IHQ/WB/IF)
<i>YAP (H-9)</i>	Santa Cruz Biotechnology	Sc-271134	Monoclonal (IF)

Tabla M-5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la experimentación.

1.6. Sondas para RT-PCR cuantitativa.

GEN ¹	Cebador sentido	Cebador antisentido	Origen
<i>CDH1</i>	5'GGTCTGTCATGGAAGGTGC3'	5'GATGGCGGCATTGTAGGT3'	Sigma-Aldrich
<i>CTGF</i>	5'TTAGCTCGGTATGTCTTCATGC3'	5'TGACCTGGAAGAGAACATTAAGAAG3'	Sigma-Aldrich
<i>CYR61</i>	5'AGTGCCGCCTTGTGAAAG3'	5'TGGTCTTGCTGCATTTCTTG3'	Sigma-Aldrich
<i>DUSP10</i>	5'CCCAGCCACTTCACATAGTC3'	5'TACTAAGTCCACCTTTCAACACC3'	Sigma-Aldrich
<i>EP1</i>	5'GTCGGTATCATGGTGGTGTG3'	5'CGCAGTAGGATGTACACCCA3'	Sigma-Aldrich
<i>EP2</i>	5'GTCTGCTCCTTGCCCTTTCAC3'	5'TGAACGCATTAGTCTCAGAAC3'	Sigma-Aldrich
<i>EP3</i>	5'TCAACCTTGATGTGGAGCGA3'	5'GCAAATTCAGGGAAGCAGGA3'	Sigma-Aldrich
<i>EP4</i>	5'TCTTACTCATTGCCACCTCCC3'	5'GTTGACGAATACTCGACCCAC3'	Sigma-Aldrich
<i>GAPDH</i>	5'GCACAAGAGGAAGAGAGAGAGACC3'	5'AGGGGAGATTCAGTGTGGTG3'	Sigma-Aldrich
<i>HPRT</i>	5'CTGGAAAGAATGTCTTGATTGTGG3'	5'CATCTTTGGATTATACTGCCTGAC3'	Sigma-Aldrich
<i>MPGES-1</i>	5'CTGGTCATCAAGATGTACGTG3'	5'GGGTAGATGGTCTCCATGTC3'	Sigma-Aldrich
<i>MPGES-2</i>	5'TCGCAACAATAAATGACTCC3'	5'CTGGGTAGTAGGTGATGATCT3'	Sigma-Aldrich
<i>NFATc1</i>	5'CCAAGGTCATTTTCGTGG3'	5'GGTCAGTTTTCGCTTCCA3'	Grupo Taper
<i>NFATc2</i>	5'CATCTAACCCCATCGAGT3'	5'GCTGTCTGTGCTTGTCT3'	Grupo Taper
<i>NFATc3</i>	5'CGACGAGCTCGACTTCAA3'	5'GCACAATCATCTGGCTCA3'	Grupo Taper
<i>NFATc4</i>	5'GGGACACAGCCCTATCTT3'	5'GGCTCTAGGCTGTACCTC3'	Grupo Taper
<i>NFAT5</i>	5'AGTCAGACAAGCGGTGGT3'	5'GAGGAGGGAGCTGAAGAA3'	Grupo Taper
<i>P21</i>	5'TCACTGTCTTGTACCCTT3'	5'GGCGTTTGGAGTGGTAGA3'	Grupo Taper
<i>PGFS</i>	5'TTCTCCAATGTCTAAAGCC3'	5'ATCCTGCATCCTTACACTTGTC3'	Sigma-Aldrich
<i>PTGS1</i>	5'GAAACCCTACACCTCCTCC3'	5'GCATCAATGTCTCCATCAAAT3'	Sigma-Aldrich
<i>PTGS2</i>	5'CGAGGTGTATGTATGAGTGTG3'	5'GTGTTTGGAGTGGGTTTCAG3'	Sigma-Aldrich
<i>RCAN1</i>	5'GCATAAGACTGAGTTTCTGGG3'	5'AACTGCTTGTCTGGATTTGG3'	Sigma-Aldrich
<i>YAP</i>	5'AATCCCACTCCGACAGG3'	5'GACTACTCCAGTGGGGTCA3'	Sigma-Aldrich

Tabla M-6. Lista de sondas utilizadas para amplificar cada gen de interés. ¹Todos las secuencias utilizadas para el diseño de los cebadores pertenecen a genes humanos.

2. Métodos.

2.1. Transfección transitoria.

Las líneas celulares a transfectar se sembraron en placas de 12 ó 6 pocillos aproximadamente 24 h antes de la transfección con medio completo sin antibióticos. Las transfecciones de ADN se realizaron por medio de partículas lipídicas siguiendo el protocolo de *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen, Life Technologies) o *Metafectene® Pro* (Biontex). Los plásmidos a transfectar se prepararon de manera independiente a las concentraciones necesarias en medio libre de suero (*OptiMEM*). Se cambió el medio de cultivo de la transfección por un medio de cultivo completo pasadas las primeras 24 h post-transfección. En las siguientes 24-72 h se utilizaron las células transfectadas para los diferentes análisis requeridos en cada experimento.

2.2. Clonaje y crecimiento bacteriano.

El clonaje se inició amplificando la secuencia de *DUSP10* por PCR con los cebadores específicos, se ligó en el vector *pCRII* con resistencia a ampicilina y kanamicina y, finalmente, se transformó el producto de la ligación en bacterias *Escherichia coli* (*INVαF'*) competentes siguiendo el protocolo del *TA Cloning® Kit* (KA2000, Invitrogen). Las bacterias transformadas se sembraron en placas *Petri* con medio LB agar, 50 µg/ml de Kanamicina y 40 mg/ml de *X-Gal* para selección por medio de la expresión del gen de la β-galactosidasa (colonias blancas/azules). Las colonias blancas aisladas, con alta posibilidad de portar el inserto, se crecieron en 5 ml de medio LB líquido y 50 µg/ml de kanamicina a 37°C durante 16 h. La extracción y purificación de los plásmidos se realizó utilizando *Spin Miniprep Kit* (#27106, Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos aislados se resolvieron en un gel de agarosa tras ser digeridos con las enzimas *BamHI* y *XbaI*. Los plásmidos positivos que portaban el inserto se enviaron a secuenciar. Seguidamente, se realizó una digestión con *BamHI* y *XbaI* (New England BioLabs) del vector *pCRII* portador del ADNc de *DUSP10* y el vector *pLenti-CMV/TO-Hygro*, independientemente. Se extrajo y purificó el ADNc para *DUSP10* y se ligó con el vector *pLenti-CMV/TO-Hygro* con T4 ligasa (New England BioLabs) siguiendo el protocolo del fabricante, habiendo sido ambas secuencias digeridas, analizadas e identificadas en un gel de agarosa al 1%. Se realizó una transformación en las bacterias *Escherichia coli* (*DH5α*) competentes con el producto de la ligación siguiendo el protocolo del fabricante (*Servicio de Fermentaciones* del CBMSO) y se sembraron en placas LB agar con 100 µg/ml de ampicilina.

Por otro lado, los plásmidos del *stock* de glicerol bacteriano con el vector *pLenti-KO.1-Puro* portadores de las secuencias de *shRNA* se sembraron en placas Petri con medio LB agar con 100 µg/ml de ampicilina y se dejaron crecer a 37°C durante 16 h.

En ambos casos, tras la selección de colonias aisladas, éstas se crecieron en 5 ml de medio LB líquido y 100 µg/ml de ampicilina a 37°C durante 16 h y la extracción y purificación de los plásmidos se realizó utilizando *Spin Miniprep Kit* (#27106, Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Con el fin de comprobar que los plásmidos se habían amplificado correctamente se realizaron digestiones de los plásmidos purificados con la enzima *EcoRI* (New England BioLabs) según las instrucciones del fabricante, durante 2 h que se resolvieron mediante un gel de agarosa al 1%. Finalmente, los cultivos de bacterias con los plásmidos positivos se crecieron en 500 ml de medio LB líquido con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C durante 16 h y se purificaron los plásmidos finales utilizando *Plasmid Maxi Kit* (#1216, Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

2.3. Expresión estable.

La generación de las líneas celulares HT29-lucD6 y HCT116 con la sobreexpresión estable de COX2, ACN y DUSP10 o con el silenciamiento de DUSP10, según el caso, se realizó utilizando partículas lentivirales generadas mediante el sistema *ViraSafe Lentiviral Bisistronic Expression System* (Cell Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las partículas virales se produjeron en células HEK-293T por transfección transitoria mediante el uso de los vectores plasmídicos formadores del virus *pRSV-Rev*, *pCMV-Vsvg* y *pCgpV* y los vectores de expresión *pSMPUW* o *pLenti* deseados. El medio de cultivo con las partículas virales (medio viral) generadas se recogió a las 24 y 48 h, utilizándose para infectar las células HT29-lucD6 y HCT116, cuando éstas se encontraban alrededor de un 50% de confluencia. La infección se realizó añadiendo suspensión viral mezclado con medio de cultivo completo en proporción 1:1 sobre las líneas celulares a infectar, junto con 8 µg/ml de polietilenglicol para aumentar la eficiencia de infección. Dos días después del último ciclo de infección, los cultivos celulares se comenzaron a seleccionar añadiendo los respectivos antibióticos, dependiendo del plásmido utilizado. La selección y mantenimiento a largo plazo de las líneas que sobreexpresaban COX2 (COX2) o calcineurina activa (ACN) y su control (CT) se realizó añadiendo 2 µg/ml de blasticidina. La sobreexpresión de DUSP10 (DUSP10) y su vector control (EV) se hizo con el uso de 200 µg/ml de higromicina B, mientras que los silenciamientos de DUSP10 (shDUSP10) y su vector control (SCR) se trató de manera continua con 4 µg/ml de puomicina. Dicha

selección, con renovación de medio diario, duró aproximadamente una semana más. Finalmente, la expresión de los insertos fue analizada en los diferentes cultivos celulares por RT-qPCR y WB con el fin de seleccionar el/los más idóneo/s.

2.4. Obtención y análisis de ADN.

El ADN plasmídico fue purificado mediante el uso de *Spin Miniprep Kit* (Qiagen) y *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La amplificación de ADN codificante se realizó por PCR en un termociclador *MyCycler™* (Bio-Rad) siguiendo el protocolo de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (#M7801, Promega). Los productos de ADN se mezclaron con solución de carga de azul de bromofenol 1x y se resolvió en un gel de agarosa al 1%, al que se añadió *GelRed* (BioNova), sumergido en solución TAE 1x. Se utilizó una escalera de ADN de 100 pb (#76712, Affimetrix) y la secuencia del fago *Lambda* digerida por la enzima *HindIII* (125-23.130 pb, suministrado por el CBMSO) como marcadores de tamaño de banda de ADN. Las bandas de interés se separaron mediante electroforesis y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta *UVIdoc System* (UVITEC).

2.5. Obtención y análisis de ARN.

2.5.1. Extracción de ARN.

El ARN total se extrajo tanto de células cultivadas *in vitro* como de muestras de tejidos con el reactivo *TRIzol* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La homogenización celular de los cultivos *in vitro* se realizó por raspado mecánico, mientras que la homogenización de las muestras de tejido se realizó utilizando disgregación mecánica con *Kinetics Polytron Stand* (Fisher Scientific). El ARN obtenido se cuantificó y comprobó su grado de pureza con un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific).

2.5.2. RT-PCR cuantitativa.

El análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR a tiempo real se realizó con ADNc obtenido con *GoScript™ Reverse Transcriptase* (Promega) o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) a partir de 500 ng de ARN aislado de células o tejido de estudio. Las condiciones de la RT-PCR fueron las siguientes: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. El producto de ADNc obtenido en la RT-PCR se amplificó usando cebadores específicos y el protocolo de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega). Los niveles relativos de ARNm se obtuvieron y se calcularon a partir de la señal de amplificación por encima de la muestra respecto al control, siendo la línea umbral (Ct), mediante el *LightCycler v3.5 Software* (Roche) o *ABI PRISM 7900HT SDS v2.4 Software* (Applied Biosystems). La ecuación utilizada para calcular la

cantidad relativa se define como: $2^{-[(Ct(\text{gen estudio})-Ct(\text{gen control})) \text{ muestra estudio} - (Ct(\text{gen estudio})-Ct(\text{gen control})) \text{ muestra control}]}$. Cada reacción se realizó por duplicado y los valores se normalizaron al nivel de expresión del gen control (HPRT o GAPDH), el cual no varió su expresión entre las líneas celulares y las condiciones experimentales.

2.6. Obtención y análisis de proteínas.

2.6.1. Extracción de proteína total.

Las muestras de cultivos *in vitro* se lavaron dos veces con PBS frío, se añadió tampón de lisis y se homogeneizaron mediante un raspado mecánico. Las muestras de tejidos (5 mg), proveniente de los tumores extraídos de los ratones, se homogeneizaron mecánicamente mediante el uso de *Kinetics Polytron Stand* (Fisher Scientific) con el tampón de lisis de proteína. En ambos casos se mantuvieron las muestras en frío constantemente. El tampón de lisis utilizado (100-500 µl) para la extracción de proteína se complementó con inhibidores de fosfatasa (*PhoStop*) y proteasas (*Compleat-EDTA free*). Los lisados celulares se centrifugaron a 12.000 x g a 4°C durante 15 min. La concentración proteica se determinó utilizando el método de *BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology) o el método de *Bradford* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se leyó la absorbancia utilizando un lector *Bio Kenetics Reader EL340* (Bio-Tek Instrument) y utilizando una curva patrón con cantidades de proteína BSA conocidas se determinaron las concentraciones de la muestra.

2.6.2. Extracción de proteínas citosólicas y nucleares.

Las células se sembraron con una densidad mínima de $2-5 \times 10^6$ células por placa P100. Las células se levantaron por tripsinización, se centrifugaron a 1.200 rpm y se lavaron con PBS estéril 3 veces. Tras el lavado, se resuspendieron las células en 400 µl de tampón A complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, manteniéndose en hielo durante 15 min. A continuación, se añadió 0.1-0.6% de NP-40 y tras una breve agitación, se centrifugó a 4°C a 3.000 rpm. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación corresponde a la fracción citosólica. El precipitado, conteniendo los núcleos, se lavó con 500 µl de tampón A (sin NP-40) y se centrifugaron durante 30 seg a 4 °C a 6.000 rpm. Sin resuspender, se añadió 50 µl de tampón C (4°C) al precipitado y se agitaron suavemente durante 20 min a 4°C. Tras ese periodo, se centrifugaron los núcleos ya fraccionados durante 10 min a 4°C a 14.000 rpm. Finalmente, tanto para el sobrenadante obtenido de proteína nuclear como la proteína citosólica se cuantificó la cantidad de proteína por el método de *Bradford*.

2.6.3. Análisis por electroforesis e inmunodetección (*Western Blot*).

Una porción de las muestras de proteína (10-20 µg) se mezclaron añadiendo tampón de carga, se hirvieron durante 8 min a 100°C y se resolvieron mediante la separación por peso molecular en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 8%, 10% o 15% (SDS-PAGE). La separación de las proteínas por tamaño se realizó en cubetas específicas para electroforesis (Bio-Rad) aplicando un voltaje constante de 100 V en solución de electroforesis durante un tiempo determinado. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm de poro (Bio-Rad) utilizando el sistema de transferencia húmedo (Bio-Rad) durante 1 h y 30 min a 100 V en tampón de transferencia. La membrana se bloqueó en 5% BSA disuelto en TBS-T durante 2 h. Tras este proceso, se realizó la incubación con el anticuerpo primario específico diluido en 3% BSA-TBS-T durante una noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa. La señal quimio-luminiscente se detectó utilizando los componentes de *SuperSignal West Dura Substrate* (Pierce Biotechnology), permitiendo reaccionar la peroxidasa conjugada a los anticuerpos y potenciar la señal siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la identificación de las proteínas de interés se visualizaron tras la exposición y revelado con películas autorradiográficas (AGFA). El densitometrado de las bandas de proteína de interés se realizó mediante el programa informático *ImageJ*.

2.7. Inmunoprecipitación.

Un elevado número de células se incubaron en placas P100 durante 24 h mínimo. Las células se levantaron por tripsinización, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1.200 rpm, repitiendo este proceso 3 veces. A continuación, las células se lisaron con la solución de lisis de IP (300-500 µl) completado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se dejó actuar durante 30 min en hielo. Pasado ese tiempo, se centrifugó el lisado a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C y se guardó el sobrenadante de proteína. La proteína necesaria para inmunoprecipitar (1 mg) se cuantificó por el método de *Bradford*. En el proceso se utilizó la proteína A/G (Thermo Scientific), previamente equilibrada con varios lavados de PBS. Tras el equilibrado, las bolas de proteína A/G se dejaron 2 h incubando con el extracto de proteína a 4°C en agitación con el fin de eliminar las proteínas del lisado con unión directa a la proteína A/G. Posteriormente, tras ser eliminadas las bolas, se añadió el anticuerpo (1:50) al sobrenadante de proteínas ya sin bolas y se mantuvieron en incubación durante una noche a 4°C en agitación. Seguidamente, se añadieron bolas nuevas (equilibradas) a la proteína y

se dejaron incubando nuevamente durante la noche a 4°C en agitación. Seguidamente, tras varios lavados con PBS y centrifugaciones de 1 min a 13.000 rpm y 4°C, se añadió solución de carga 2x (25 µl aprox.) y se hirvieron durante 5 min a 100°C. Finalmente, se resolvió el inmunoprecipitado por SDS-PAGE e inmunoblot.

2.8. Inmunofluorescencia.

Las células en cultivo se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cristales de 12 mm de diámetro (Thermo Scientific) esterilizados y colocados previamente en la base de cada pocillo. Realizado el experimento respectivo, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS, se fijaron en 4% PFA libre de metanol y *RNasa* (Electron Microscopy Science) durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, los cristales se lavaron dos veces con PBS. Las células fijadas se permeabilizaron con 0.3% Tritón X-100 en PBS durante 20 min y se bloquearon con 1% BSA-PBS-0.1% Tritón X-100 durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario específico diluido en 1% BSA-PBS en una cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras tres lavados con PBS, los cristales se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. Se lavaron los cubreobjetos tres veces con PBS y se tiñeron con 1 µg/ml DAPI (Merk). Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje *Prolong Gold Antifade Reagent* (Molecular Probes). La visualización de la fluorescencia se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal LSM510 acoplado a una cámara *Axiomager M1* (Zeiss). La cuantificación de la señal de fluorescencia se realizó utilizando el programa *ImageJ*.

2.9. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

Las células se crecieron en placas de cultivo de 6 pocillos en las condiciones experimentales necesarias. Tras finalizar el experimento, se recolectaron las células por tripsinización, se lavaron 3 veces con PBS frío y se centrifugaron a 1.500 rpm a 4°C durante 10 min. Se fijaron las células añadiendo suavemente un 1 ml de 70% etanol frío. Las células fijadas se guardaron a -20°C durante un periodo mínimo de 18 h. Tras este proceso, las células se lavaron varias veces con PBS y centrifugaron a 3.000 rpm y 4°C durante 5 min. Antes del análisis, las células se marcaron con tampón de ciclo *PI/RNase Staining Buffer* (BD Bioscience) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. El ciclo celular se analizó en un citómetro de flujo *FACSCalibur* (BD Bioscience) y el programa *Cell Quest-Pro Software* (BD Bioscience).

2.10. Ensayos de proliferación y supervivencia.

2.10.1. Contaje celular.

Las células fueron crecidas en placas de 6 pocillos en una densidad de 1×10^4 células por pocillo. Durante 8 días, se levantaron cada 2 días por tripsinización y se contaron el número de células utilizando una cámara de contaje *Neubauer*. Las células se mantuvieron en los mismos pocillos durante todo el experimento, ya que tras ser levantadas para ser contadas fueron nuevamente sembradas en los mismos pocillos.

2.10.2. Crecimiento a tiempo real.

El crecimiento a tiempo real se realizó con el sistema *xCELLigence* (Roche Diagnostics GmbH and ACEA Biosciences, Inc). Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en placas específicas *E-plate 16* (Roche) mantenidas en medio completo. Se siguió el crecimiento celular, midiendo la capacitancia cada 5-15 min, durante 48-120 h aprox. dependiendo del experimento. Los resultados se analizaron mediante el sistema *Real-Time Cellular Analyser Software v1.1* (Roche) y la proliferación se expresó como índice celular (CI). El CI representa el estatus de las células monitorizadas (número celular, viabilidad celular, movilidad y grado de adhesión), siendo un parámetro adimensional.

2.10.3. Formación de colonias.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad celular de 1×10^3 células por pocillo. El medio de cultivo se cambió cada 2 días durante los 8 días que duró el experimento. Las células se lavaron varias veces con PBS y se fijaron en 4% PFA (Sigma) durante 20 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron 3 veces más con PBS y se dejaron secando a temperatura ambiente. A continuación, se tiñeron con 0.5% de Cristal Violeta en agua-50% metanol durante 30 min a temperatura ambiente. Tras ser eliminado el exceso de colorante con abundante agua, se dejaron secar completamente. Las imágenes se obtuvieron en un escáner convencional del *Servicio de Reprografía* del CBMSO. El número de colonias se analizó con el *ImageJ Software* estableciendo un límite en tamaño y circularidad.

2.10.4. Ensayo colorimétrico MTT.

Se sembraron 5×10^3 células en placas de 96 pocillos, donde cada condición experimental se encontraba representada en cada experimento un mínimo de 4 veces. Entre 3-4 h antes de finalizar el experimento, se añadió al 10% (v/v) el reactivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Se eliminó el sobrenadante y se añadió 150 μ l de DMSO (Sigma-Aldrich) e isopropanol (Sigma-Aldrich) en proporciones 1:1 junto con un ácido acético al

0.3% (Sigma-Aldrich). Se mantuvo en agitación durante 2 min y se leyeron las absorbancias a 495 nm en un lector multiplaca de absorbancia *iMark™* (Bio-Rad). Este ensayo colorimétrico mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa, que en el caso de las células tumorales muestra el porcentaje de viabilidad celular.

2.10.5. Ensayo fluorimétrico *AlamarBlue®*.

Se sembraron 3.5×10^4 células en placas de 96 pocillos, donde cada condición experimental se encontraba representada en cada experimento un mínimo de 4 veces. Unas 6-8 horas antes de la finalización del experimento, se añadió el reactivo Resazurin (*AlamarBlue®*) en el medio de cultivo a una concentración final de 10% (v/v). Tras ese periodo, se recogió el sobrenadante y se transfirió a una placa P96 con fondo negro (Fisher Scientific). La lectura de la fluorescencia se realizó mediante la excitación a 560 nm y emisión a 590 nm utilizando el lector *FLUOstar OPTIMA* (BMG LABTECH, Germany). Los resultados se normalizaron con respecto a los controles en cada experimento. El seguimiento de la proliferación se realizó sobre los mismos cultivos celulares, añadiendo medio nuevo a las placas de 96 pocillos con el tratamiento deseado sembradas el primer día y realizando tantas medidas como se desearon, pudiendo los resultados ser normalizados al primer día experimental. Finalmente, los datos obtenidos se representaron como porcentaje de viabilidad celular, indicativos de la proporción de daño celular registrado tras los tratamientos.

2.10.6. Incorporación de timidina tritiada.

Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos (5×10^3 células por pocillo) en medio completo con suero. Se trataron las células a las 18 h post-siembra. Unas 12 h antes de finalizar el experimento se añadió timidina tritiada al 10% (v/v) en el medio de cultivo. Pasado ese tiempo, se detuvo la reacción mediante congelación de la placa a -20°C durante un mínimo de 24 h. Tras la descongelación a temperatura ambiente, se pasó el medio de cultivo celular a través de varios lavados con un *FilteMate Harvester* (PerkinElmer) por un filtro *Printed Filtermat A* (PerkinElmer). Tras el secado del filtro, se fundió cera de centelleo *Meltilex™ A* (PerkinElmer). Finalmente, se descongeló la placa y se midió el número de cuentas por minuto (cpm) de timidina tritiada en un medidor de centelleo *Liquis Scintillation & Luminiscence Counter 1450 Microbeta* (Wallac and Trilux).

2.11. Ensayos celulares *in vitro*.

2.11.1. Densidad celular.

Las células en confluencia se sembraron 10 veces más concentradas que las células en dilución. Después de 48 h, las células en dilución habían formado pequeñas colonias (4-8 células) y se encontraban dispersas por la placa iniciando un crecimiento celular exponencial, mientras que las células en confluencia formaron una monocapa. Todos los cultivos se mantuvieron en medio con suero.

2.11.2. Ausencia de suero.

Las células fueron sembradas a un 60% de ocupación de la placa con medio completo con suero. Tras 18 h post-siembra, el medio de cultivo completo fue sustituido por medio sin suero durante 24, 48 y 72 h. Finalmente, terminado el tiempo experimental, los cultivos fueron procesados para su análisis.

2.11.3. Genotoxicidad.

Las células fueron sembradas a un 40 % de densidad celular en medio de cultivo completo 24 h antes a ser tratadas. Los quimioterapéuticos fueron añadidos de forma individualizada a los cultivos celulares a diferentes tiempos. El pocillo control fue tratado con DMSO únicamente a un porcentaje máximo del 1% del volumen total.

2.11.4. Estrés osmótico.

Las células fueron tratadas con cloruro sódico (NaCl) a 100 mM suplementado en un medio completo con suero y nivel de sales estándar durante diferentes tiempos.

2.12. Histología e Inmunohistoquímica.

Los tumores y las secciones de colon que se extrajeron de los ratones fueron lavados con PBS antes de ser fijados en 4% PFA pH 7.4 (Sigma-Aldrich) durante 24 h aprox. Posteriormente, los cortes del tejido se sometieron a un proceso de deshidratación de 20 min utilizando diluciones crecientes de etanol, empezando con etanol al 75%, etanol al 95% y etanol al 100%; todos los pases fueron realizados por duplicado. Finalmente, se realizaron dos pasos de 30 min en xileno. Las muestras pasaron a ser sumergidas en 2 baños de 1 h de parafina a 65°C. Las muestras de tejido se incluyeron en parafina y se montaron los bloques para su conservación y posterior estudio. Los bloques de parafina de pacientes humanos para el estudio de enfermedades inflamatorias intestinales fueron amablemente cedidos por el equipo del Dr. J.P. Gisbert del Servicio de Aparato Digestivo del *Hospital*

de la Princesa (Madrid, España). Del mismo modo, el TMA de 73 pacientes con CCR fueron preparadas y cedidas amablemente por el equipo de la Dra. L.L. Kodach del Departamento de Patología del *Amsterdam Medical Center* (Ámsterdam, Países Bajos). Sin embargo, el TMA de 999 pacientes fue amablemente cedido por el equipo del Dr. P.Kuppen (Reimers et al., 2014) del Servicio de Patología del *Leiden Medical Center* (Leiden, Países Bajos). Ambos casos gracias a la implicación de los Dr. J. Hardwicks y Dr. L. Hawinkels del Departamento de Gastroenterología del *Leiden Medical Center* (Leiden, Países Bajos).

Los bloques de tejidos, tanto procedentes de muestras de ratones como humanas, se procesaron de igual modo para su estudio por inmunohistoquímica (IHQ). Se realizaron cortes de 3-4 μm de grosor utilizando un microtomo *Shandon FINNESSE ME+* (Thermo Scientific). Las secciones se colocaron sobre un portaobjetos (DAKO) y fueron calentadas durante 30 min a 65°C antes de iniciar el proceso de desparafinización, que comprende 2 inmersiones de 10 min cada uno de los portaobjetos con la muestra en xileno, etanol 100%, etanol 95%, etanol 75%, etanol 50% y H₂O. El desenmascaramiento de los epítomos se realizó utilizando el compuesto *Antigen Retrieval* (DAKO) durante 2 min en una olla a ebullición para las muestras de ratones; o 10 min en el microondas a 700 W con solución 0.01 M sodio-citrato y solución 0.1 M ácido cítrico a pH 6 para las muestras humanas.

Los portaobjetos se trataron con metanol-0,3% agua oxigenada durante 15 min a temperatura ambiente para bloquear la actividad de peroxidasas endógenas. Tras varios lavados con PBS, las secciones se bloquearon con 1% BSA en PBS durante 1 h y se dejaron toda la noche incubando a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente disuelto en solución de bloqueo. Tras varios lavados con PBS, las secciones se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con Biotina o HRP (DAKO). En el caso de ser utilizados anticuerpos secundarios biotinilados (cuya finalidad es amplificar la señal), se incubaron durante 30 min con los sustratos del *ABC Kit* (Vectorlabs) siguiendo las instrucciones del fabricante para conjugarlos con la proteína HRP. Finalmente, todas las muestras se revelaron utilizando la solución DAB (*Liquid DAB + substrate chromogen system*, DAKO) durante máximo 5 min siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente al montaje de las muestras, se contratiñeron con hematoxilina y se deshidrataron mediante 2 lavados de 5 min con etanol 75%, etanol 95%, etanol 100% y xileno. Tras el último lavado con xileno, las muestras de ratón se montaron con medio *Eukitt*® (Sigma) y las muestras humanas con *Entellan New* (Millipore). Todas las imágenes fueron tomadas con un microscopio de campo claro *Axiovert200* (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color (*SPOT RT Slider*).

2.13. Modelos *in vivo*

Los animales de experimentación, su mantenimiento y los experimentos cumplieron con legislación vigente Nacional Española y de la Unión Europea. Además, todo fue supervisado y avalado por el Comité Ético de Bienestar Animal del CBMSO. El veterinario responsable de los animales, Lda. B. Barrocal contando con el certificado de experimentación animal de categoría B y C, supervisó, aconsejó y dirigió el manejo de los animales. En cuanto a la doctoranda, cuenta con la acreditación de categoría B para el manejo de animales. Todos los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ tras finalizar el experimento o anticipadamente cuando su calidad de vida se vio reducida por causa directa o indirecta a la experimentación.

2.13.1. Xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos.

En estos experimentos se utilizaron ratones hembra inmunodeprimidos *Swiss Nude* (Crl:NU(lco)-Foxn1^{nu}) procedentes de *Charles River Laboratory* (Wilmington, MA). Grupos de 5-6 ratones fueron inyectados subcutáneamente en el flanco posterior del animal con 1x10⁶ células de la línea celular HT29-lucD6 o HCT116 generada para expresar o silenciar DUSP10. El crecimiento tumoral fue seguido mediante medición de volumen del tumor y emisión de bioluminiscencia (BLI) durante 7-8 semanas consecutivas hasta finalizar el experimento. El crecimiento tumoral se midió utilizando un calibre manual y el volumen tumoral se estimó siguiendo la ecuación $([\text{ancho}]^2 \times [\text{largo}])/2$. La BLI se midió inyectando intraperitonealmente el sustrato luciferina (150 µg por gramo de peso del ratón) y dejándolo 10 min para la correcta distribución por el organismo del animal. Pasado ese tiempo, se anestesiaron los animales con isofluorano (Forane) inhalado mediante un equipo de anestesia gaseoso. Este equipo permitió mantener a los animales anestesiados durante el tiempo necesario para registrar la BLI emitida. Se midió la emisión de BLI de las líneas HT29-lucD6 utilizando el equipo *IVIS Lumina II* (Caliper Life Sciences) y se cuantificó con el *Living Image® Software*. Los datos resultantes se normalizaron al primer día de medición de BLI en cada animal y las medias de los grupos se representaron finalmente como cantidad de fotones/segundo.

2.13.2. Modelo de cáncer asociado a colitis (CAC).

Se utilizaron grupos de 5-6 ratones de fondo genético BALBcJ (*Charles River Laboratory*) de 8 semanas de edad tanto machos como hembras para el desarrollo de este modelo *in vivo*. A día 0 de experimento, se inyectaron intraperitoneal 10 mg/kg del carcinógeno azoximetano (AOM)

por ratón. Tres días post-inyección, se inició el primer ciclo de 4 días completos en los que se mantuvo el agua de la bebida con 2% (p/v) de sulfato sódico de dextrano (DSS). Previa administración a los animales, el agua con DSS se esterilizó por filtración. El tratamiento se repitió un total de 5 ciclos con un periodo de recuperación de 15 días aproximadamente entre ciclo. Durante el desarrollo del experimento se controló tanto el peso de los animales (antes y después de cada tratamiento) como la deposición, el estado de las heces, sangrados y posibles prolapsos rectales, todo ello permitió conocer el estado de los animales durante el experimento. Tras finalizar el experimento, se extrajo el colon completo para su estudio por IHQ.

2.14. Análisis estadísticos

Los estudios estadísticos se realizaron con el programa *GraphPad Prism v5.0* para la mayoría de los resultados. El test de *t-Student* fue utilizado para comparar las medias de datos cuantitativos. El estudio de ANOVA de dos factores con el post-test de *Bonferroni* fue utilizado para analizar la varianza de datos cuantitativos entre grupos. Todos los experimentos *in vitro* se representaron como la media \pm SEM (error estándar de la media). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el p-valor era igual o menor de 0.05. Se representó la significancia como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Se utilizó el programa SPSS v.23 para el análisis estadístico de las muestras de los pacientes. Se realizaron estudios estadísticos de correlación, comparación por Chi-cuadrado y curvas de supervivencia por el estadístico de *Kaplan-Meier* y estimaciones de riesgo con la Regresión de Cox. Los datos fueron significativos cuando el p-valor fue igual o menor de 0.05.

RESULTADOS

1. *DUSP10* es un gen inducido por la actividad de COX2 en CCR.

Años atrás, se detectó una alta expresión de COX2 en las células epiteliales de la mucosa intestinal en el 85% de los adenomas colorrectales (Eberhart et al., 1994). En este sentido, se considera a COX2 una importante diana terapéutica en el control y desarrollo del cáncer de colon, haciendo que el uso de inhibidores selectivos de COX2 (COXIB) fueran tomando el relevo de los ampliamente utilizados AINES clásicos en la clínica (Coruzzi et al., 2007). Basándonos en la importancia de esta proteína, hemos utilizado células epiteliales de adenocarcinoma de colon para buscar otras dianas terapéuticas que pudieran estar relacionadas con los niveles altos de expresión de COX2 y su papel pro-tumoral en el CCR.

La línea celular HT29-lucD6 de adenocarcinoma de colon se utilizó para sobreexpresar constitutivamente la enzima COX2 (HT29-lucD6-COX2) o la forma activa de la enzima calcineurina (HT29-lucD6-ACN), que induce la expresión de COX2. Se compararon los niveles de expresión génica entre ambas líneas por *microarray* y se identificaron 78 genes cuya expresión estaba significativamente modificada comparando también con la línea control (HT29-lucD6-CT). Entre dichos genes se encontraba *DUSP10*, cuya expresión aumentaba significativamente. Mediante RT-qPCR se confirmó dicho aumento de expresión, obteniendo 7.5 veces y 3 veces más de ARNm en la línea HT29-lucD6-COX2 y en la línea HT29-lucD6-ACN, respectivamente, al comparar con HT29-lucD6-CT (**DNM**).

En la actualidad, bases de datos como *Oncomine*TM son ampliamente utilizadas para una aproximación en el conocimiento y visualización de la expresión de los genes en diferentes tejidos y enfermedades, y en la unificación de datos procedentes de diferentes estudios. Se utilizó esta herramienta para estudiar la expresión de *DUSP10* en la colección *Kaiser Colon* (Kaiser et al., 2007) compuesta por 105 muestras de cáncer de colon humano, en la cual los autores analizaron 19.547 genes mediante la herramienta *Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. En este análisis se utilizaron dos sondas diferentes para conocer las diferencias en los niveles de expresión de *DUSP10* entre tejido normal de colon y adenocarcinoma mucinoso de colon (AMC) o adenocarcinoma mucinoso rectal (AMR). La expresión de *DUSP10* se encontró significativamente elevada en AMC con respecto al tejido normal 3.2 veces ($p=4 \times 10^{-6}$) y 2.4 veces ($p=6 \times 10^{-6}$) con las sondas 221563_at y 215501_at, respectivamente (**Figura R-1A**). El mismo aumento significativo en la expresión de *DUSP10* se observó en las muestras de AMR con respecto a las muestras de colon normal en 4.3 veces ($p=8 \times 10^{-5}$) y 3.2 veces ($p=7 \times 10^{-5}$) con las sondas 221563_at y 215501_at, respectivamente (**Figura R-1B**). Este estudio

in silico muestra como la expresión de *DUSP10* se encuentra alterada en el CCR, siendo siempre más elevada en el tejido neoplásico de colon y recto.

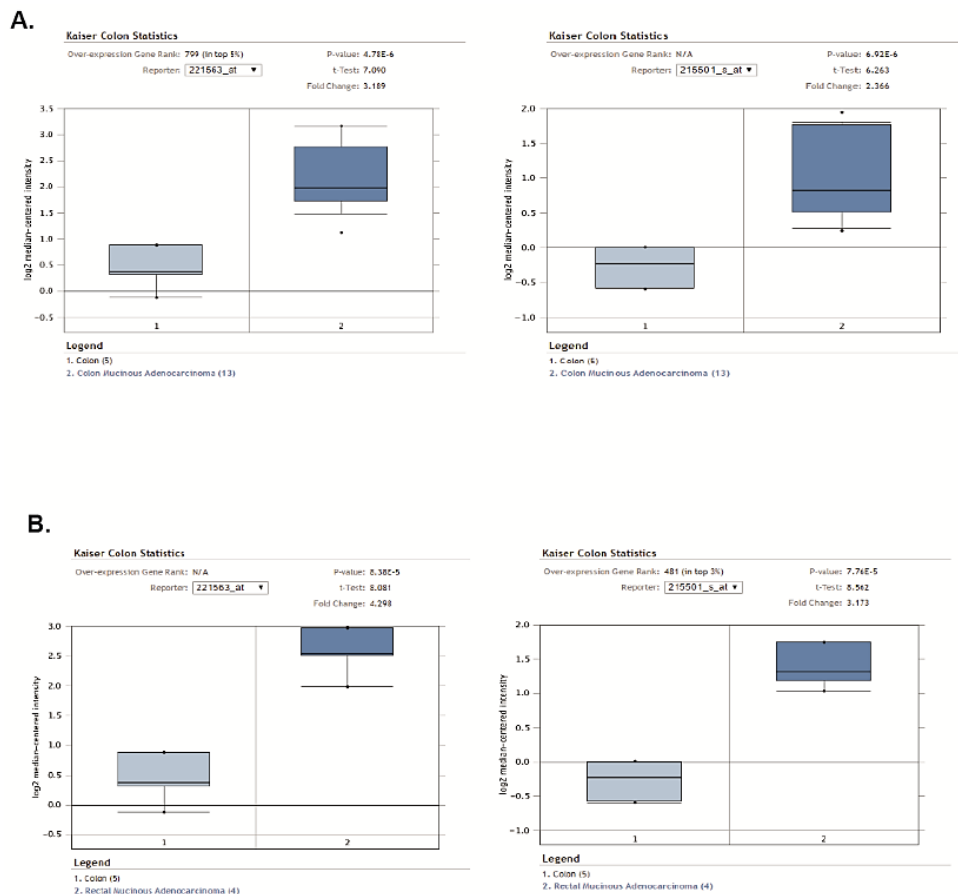


Figura R-1. La expresión de *DUSP10* es más alta en tejido de adenocarcinoma colorrectal. Utilización de la base de datos Oncomine™ para el análisis de expresión de ARNm de *DUSP10* con las sondas 221563_at y 215501_at en la colección Kaiser Colon Collection (GSE5206) entre muestras de **(A)** tejido de adenocarcinoma mucinoso de colon ($n=13$) y **(B)** tejido de adenocarcinoma mucinoso rectal ($n=4$) frente a las muestras de tejido de colon normal ($n=5$). Se realiza una prueba estadística t-Student para obtener el grado de significación ($p<0.05$) entre los grupos de estudio.

1.1. *DUSP10* se induce por COX2.

Quisimos estudiar si la relación vista entre la expresión de COX2 y *DUSP10* también se observaba en otras líneas de adenocarcinoma de colon como SW480 (línea de tumor primario) y SW620 (línea derivada de metástasis). Para ello, se sobreexpresó de manera estable COX2 en las líneas y se confirmó el incremento en los niveles de expresión de *PTGS2* (**Figura R-2A**). Del mismo modo, se observó que los niveles de expresión de *DUSP10* aumentaron en las líneas HT29 y SW480, y de forma más moderada ($p=0.058$) en la línea SW620 que sobreexpresaba COX2 (**Figura R-2B**). Confirmamos en la línea HT29-COX2 niveles más altos de proteína *DUSP10* que en la línea HT29-CT y detectamos

una disminución en los niveles de fosforilación de p38, una de las proteínas diana de la actividad fosfatasa de DUSP10 (**Figura R-2C**). Seguidamente, para comprobar si la actividad de COX2 era responsable de los altos niveles de expresión de *DUSP10*, la línea HT29-COX2 fue tratada con diferentes inhibidores de la enzima: etorocoxib y celecoxib como COXIB, y aspirina como AINES. Observamos una disminución en los niveles de ARNm de *DUSP10* del 42% y 45% tras tratar con etorocoxib y aspirina, respectivamente, resultando significativa la reducción con este último tratamiento (**Figura R-2D**).

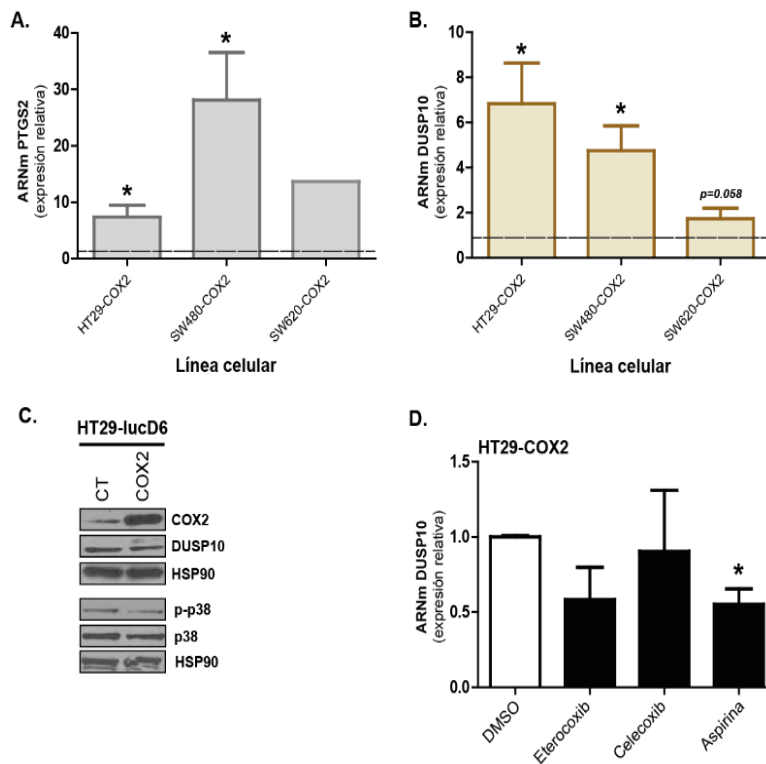


Figura R-2. Inducción de DUSP10 a través de COX2 en líneas de CCR. (A) Análisis de la expresión de PTGS2 y **(B)** DUSP10 mediante RT-qPCR en HT29-lucD6, SW480 y SW620 que sobreexpresan constitutivamente COX2 (HT29-COX2, SW480-COX2, SW620-COX2). Las líneas de sobreexpresión se compararon a su línea control. **(C)** Análisis de los niveles de proteína de COX2 y DUSP10, y niveles de fosforilación de p38 en la línea HT29-COX2 y línea control HT29-CT por WB. **(D)** Niveles de ARNm de DUSP10 tras tratar la línea HT29-COX2 con etorocoxib (1 μ M), celecoxib (1 μ M) y aspirina (1 μ M) durante 24 h. El resultado se normaliza con respecto al tratamiento control (DMSO). Todos los datos se representan como la media de expresión relativa \pm SEM (* p <0.05; ** p <0.01). Se utilizó el gen HPRT como gen de referencia en qPCR.

Las líneas de sobreexpresión se compararon a su línea control. **(C)** Análisis de los niveles de proteína de COX2 y DUSP10, y niveles de fosforilación de p38 en la línea HT29-COX2 y línea control HT29-CT por WB. **(D)** Niveles de ARNm de DUSP10 tras tratar la línea HT29-COX2 con etorocoxib (1 μ M), celecoxib (1 μ M) y aspirina (1 μ M) durante 24 h. El resultado se normaliza con respecto al tratamiento control (DMSO). Todos los datos se representan como la media de expresión relativa \pm SEM (* p <0.05; ** p <0.01). Se utilizó el gen HPRT como gen de referencia en qPCR.

1.2. Regulación de DUSP10 por PGE₂ y PGF_{2 α} .

La acción biológica de COX2 es mediada por la producción de prostanoïdes que, de manera autocrina o paracrina, a través de receptores específicos situados mayoritariamente en la membrana plasmática de las células genera una cascada de señalización mediada por AMPc y/o Ca²⁺ en función del tipo de receptor.

En el CCR, las células epiteliales tumorales tienen altos niveles de COX2 y PGE₂ (Takafuji et al., 2000). En consecuencia, nos propusimos investigar si la inducción de *DUSP10* por COX2 se debía a PGE₂. En primer lugar analizamos los niveles de expresión de los receptores de PGE₂ (EP1-EP4) y observamos que los cuatro receptores estaban expresados en la línea HT29. Sin embargo, encontramos mayores niveles de proteína del receptor EP2 y EP4 en HT29-COX2 en comparación a HT29-CT (**Figura R-3A**). A continuación, tratamos la línea HT29-CT con diferentes concentraciones de PGE₂ y observamos un aumento significativo en los niveles de *DUSP10* de 1.5 veces aproximadamente independientemente de la concentración utilizada (**Figura R-3B**). El siguiente paso fue indagar si el aumento en la expresión de *DUSP10* se debía a que PGE₂ podría estar señalizando de manera preferente a través de algún receptor de EP. Con tal fin, tratamos la línea HT29-COX2 con antagonistas de los receptores EP1, EP2 y EP3 (6809), del receptor EP4 (3848 y MF) y del receptor EP1 (GSK). Observamos que la expresión de *DUSP10* disminuyó alrededor del 30% tras el tratamiento con los inhibidores GSK y MF ($p=0.059$) (**Figura R-3C**). Al mismo tiempo, vimos como el aumento de la expresión de *DUSP10* por PGE₂ en la línea HT29-CT fue significativamente inhibido por el pre-tratamiento con GSK, 3848 y MF (**Figura R-3D**).

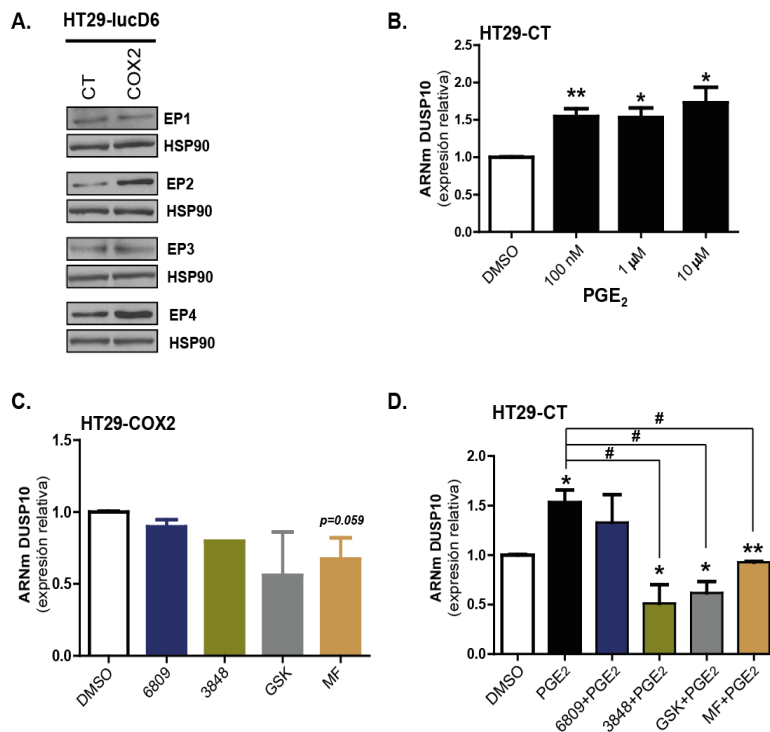


Figura R-3. Regulación de *DUSP10* a través de PGE₂. (A) Análisis de los niveles proteicos de EP1, EP2, EP3 y EP4 en la línea HT29-COX2 y HT29-CT por WB. (B) Análisis del nivel de ARNm de *DUSP10* por RT-qPCR tras tratar la línea HT29-CT con PGE₂ (100 nM, 1 μM y 10 μM) durante 24 h. (C) Análisis de las veces de expresión de *DUSP10* por RT-qPCR en la línea HT29-COX2 tratada durante 24 h con los antagonistas de los receptores de PGE (EP): AH6809 (6809, 10 μM), AH23848 (3848, 10 μM), GSK-269984A (GSK, 10 μM) y MF-

498 (MF, 10 μM). (D) Análisis de los niveles de expresión de *DUSP10* por RT-qPCR en la línea HT29-CT tras pre-tratar durante 1 h con los inhibidores de EP y 24 h con PGE₂ (1 μM). Los resultados de qPCR se normalizaron con respecto al tratamiento control (DMSO) y se utilizó el gen *HPRT* como control interno. Todos los datos se representan como la media de la expresión relativa \pm SEM (* $p<0.05$; ** $p<0.01$ con respecto al tratamiento con DMSO) (# $p<0.05$ con respecto al tratamiento con PGE_{2a}).

Esta descrito como $\text{PGF}_{2\alpha}$ se une al receptor FP promoviendo principalmente la movilización de Ca^{2+} intracelular (Milne and Jabbour, 2003). Sin embargo, PGE_2 induce Ca^{2+} intracelular y AMPc dependiendo del receptor EP al que se une (Diaz-Munoz et al., 2012; Koukoui et al., 2006). Con el fin de conocer si la inducción de DUSP10 sería o no dependiente de la movilización de Ca^{2+} y/o AMPc, tratamos la línea HT29-lucD6 durante 24 h con $\text{PGF}_{2\alpha}$, forskolina (FSK, aumenta los niveles de AMPc intracelular), PGE_2 e ionóforo de calcio A23187 (IO) y analizamos los niveles de ARNm de DUSP10. Observamos como todos los tratamientos aumentaron significativamente los niveles de DUSP10 (**Figura R-4A**). La inducción observada a nivel de ARNm correspondió con un aumento significativo de la proteína DUSP10 (**Figura R-4B**). Mediante inmunofluorescencia (IF), vimos que todos los tratamientos incrementaron la presencia de DUSP10 en el núcleo con respecto al tratamiento control, siendo el máximo detectado con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (**Figura R-4C**). Por tanto, quisimos confirmar la inducción de DUSP10 por $\text{PGF}_{2\alpha}$, via FP, tratando las líneas HT29-lucD6 con un antagonista específico de este receptor (AL8816, AL) y un inhibidor de la calcineurina (ciclosporina A, CsA) que impide la señalización por FP. El pre-tratamiento con AL y CsA disminuyó significativamente un 74% y 44%, respectivamente, el efecto de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la expresión de DUSP10 (**Figura R-4D**).

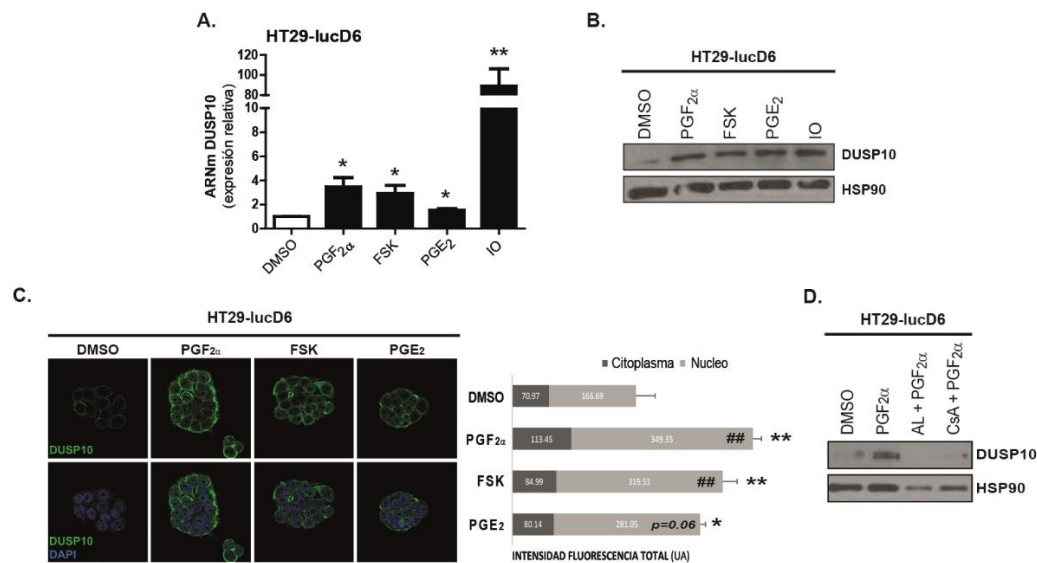


Figura R-4. Regulación de la expresión de DUSP10 por la señalización de PG. (A) Análisis de los niveles de ARNm de DUSP10 tras el tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM), FSK (1 μM), PGE_2 (1 μM) e IO (1 μM) durante 24 h por RT-qPCR. Se normalizó con respecto al tratamiento control (* p <0.05; ** p <0.01). (B) Detección de los niveles de proteínas DUSP10 con los mismos tratamientos y tiempo del apartado anterior (* p <0.05; ** p <0.01). (C) Inmunodetección por fluorescencia de la proteína DUSP10 (verde) y el núcleo de las células teñido con DAPI (azul) en las condiciones anteriormente descritas. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia bajo las imágenes de IF y representadas como unidades arbitrarias (UA). Se representa la media \pm SEM de la intensidad de fluorescencia total (* p <0.05; ** p <0.01) y la IF nuclear (### p <0.01), normalizada al tratamiento con DMSO. (D) Detección de los niveles de proteína de DUSP10 tras pre-tratar las células HT29-lucD6 durante 1 h con el inhibidor AL8816 (AL, 50 μM) y la ciclosporina A (CsA, 100 ng/ml) antes de tratar 3 h con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μM). Los geles e imágenes de fluorescencia son representativos de 3 experimentos independientes.

2. Efecto de DUSP10 en el fenotipo *in vitro* de células de CCR.

Los resultados obtenidos en relación a la ruta COX2/PG y la expresión de DUSP10 dieron pie a estudiar de manera más concreta el papel de DUSP10 en la línea HT29.

2.1. DUSP10 desfosforila p38.

A través de transducciones lentivirales se generó una línea HT29-lucD6 para sobreexpresar de manera estable el gen *DUSP10* y cinco líneas celulares para silenciar dicho gen mediante la expresión de diferentes *shRNA* (DA-DE). Comprobamos que los niveles de expresión de *DUSP10* en la línea HT29-lucD6 que sobreexpresaba dicho gen (HT29-DUSP10) aumentaron significativamente 20 veces más que en la línea control (HT29-EV) (**Figura R-5A**). Tras la selección con antibióticos de las células sobreexpresantes de *shRNA* (HT29-shDUSP10), vimos porcentajes de eficiencia de silenciamiento de *DUSP10* entre un 30% y un 70% con respecto a la línea control (HT29-SCR) (**Figura R-5B**).

Se ha descrito como la proteína DUSP10 es capaz de desfosforilar específicamente a p38 y JNK, pero no ERK. Por ello, analizamos los niveles de fosforilación de las principales MAPK: p38 $\alpha/\beta/\gamma$ (p38), JNK1/2/3 (JNK) y ERK1/2 (ERK) en condiciones de sobreexpresión y de silenciamiento de DUSP10. La forma fosforilada de p38 disminuyó significativamente un 25% menos en HT29-DUSP10 que en la línea HT29-EV, mientras que los niveles de fosforilación de JNK y ERK no se vieron reducidos con respecto a la línea control (**Figura R-5C**). Estas mismas proteínas se estudiaron en las líneas HT29-shDUSP10 donde el silenciamiento de *DUSP10* por ARNm fue más eficiente, por debajo del 50%, y correspondió con un aumento significativo en los niveles de fosforilación de p38 con respecto a la línea control. En este caso, tampoco observamos un incremento en la fosforilación de JNK y ERK dependiente de la disminución de DUSP10 (**Figura R-5D**).

2.2. DUSP10 incrementa la proliferación celular.

Durante el establecimiento de las líneas vimos como las células HT29-DUSP10 crecían más rápidamente, mientras que las líneas HT29-shDUSP10 lo hacían más lentamente, sugiriendo que la expresión diferencial de DUSP10 podría estar afectando la proliferación celular. Mediante contajes celulares, observamos cómo había significativamente un mayor número de células en la línea HT29-DUSP10 que en la línea HT29-EV.

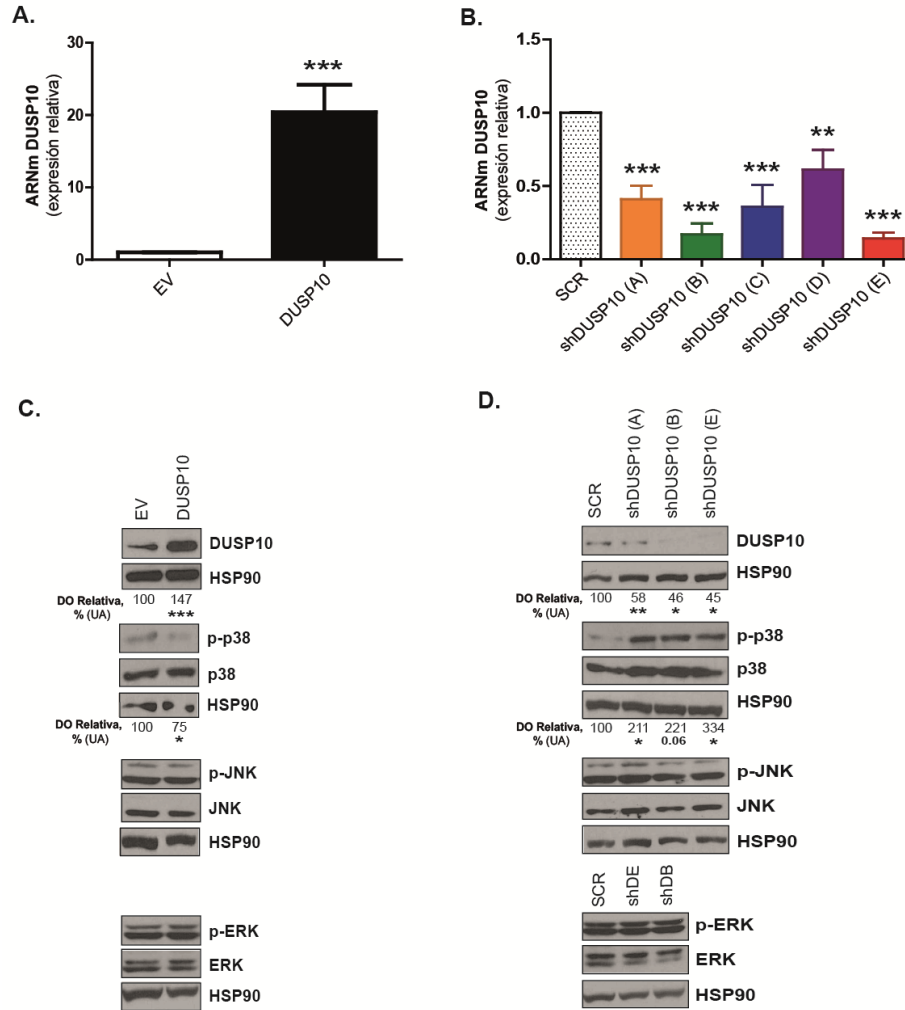


Figura R-5. Líneas HT29-lucD6 con sobreexpresión o silenciamiento de DUSP10. (A) Análisis de los niveles relativos de ARNm de la línea que sobreexpresa DUSP10 (HT29-DUSP10) de manera estable respecto a la línea control (HT29-EV) generada con un vector vacío. (B) Análisis de los niveles de ARNm de las líneas HT29-lucD6 silenciadas con el uso de 5 shRNA (HT29-shDUSP10) diferentes y usados de manera independiente. Se comparan las diferentes líneas con la línea que porta el shRNA control (HT29-SCR) (* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Se utilizó el gen HPRT como gen de referencia interno. (C-D) Detección por WB de las proteínas DUSP10, p38 fosforilada (p-p38) y total (p38), JNK fosforilada (p-JNK) y total (JNK), ERK fosforilada (p-ERK) y total (ERK) en las células HT29-lucD6 sobreexpresando o silenciando en crecimiento exponencial. En todos los casos se muestra un experimento representativo y bajo los geles se presenta la media \pm SEM de 4 experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo). En el caso de proteínas fosforiladas se normaliza con respecto a la cantidad de proteína total, mientras que el resto de proteínas se normalizan con respecto al control de carga HSP90.

Por el contrario, vimos como las tres líneas HT29-shDUSP10 proliferaron significativamente menos al terminar el experimento, siendo la diferencia significativa para dos de ellas (A y B) desde el día seis de experimento en comparación con la línea HT29-SCR (**Figura R-6A**). A partir del cuarto día experimental, se empezaron a observar las diferencias en proliferación entre las líneas. En consecuencia, el número de células contadas en ese punto experimental se utilizaron para iniciar un seguimiento de proliferación a tiempo real. Desde las primeras horas de medición, el índice celular

registrado para la línea HT29-DUSP10 aumentó más rápido que para la línea HT29-EV, siendo significativa la diferencia entre las curvas de proliferación. Por el contrario, las líneas HT29-shDUSP10 registraron un menor índice celular que la línea HT29-SCR, lo que correspondería con una menor proliferación (**Figura R-6B**). Las líneas generadas también se utilizaron para estudiar la capacidad clonogénica mediante la formación de colonias. Observamos como la línea HT29-DUSP10 formó significativamente un mayor número de colonias por pocillo que la línea HT29-EV, mientras que las líneas HT29-shDUSP10 formaron un menor número de colonias que su control HT29-SCR, llegando a ser esta diferencia significativa en HT29-shDUSP10 (A) (**Figura R-6C**).

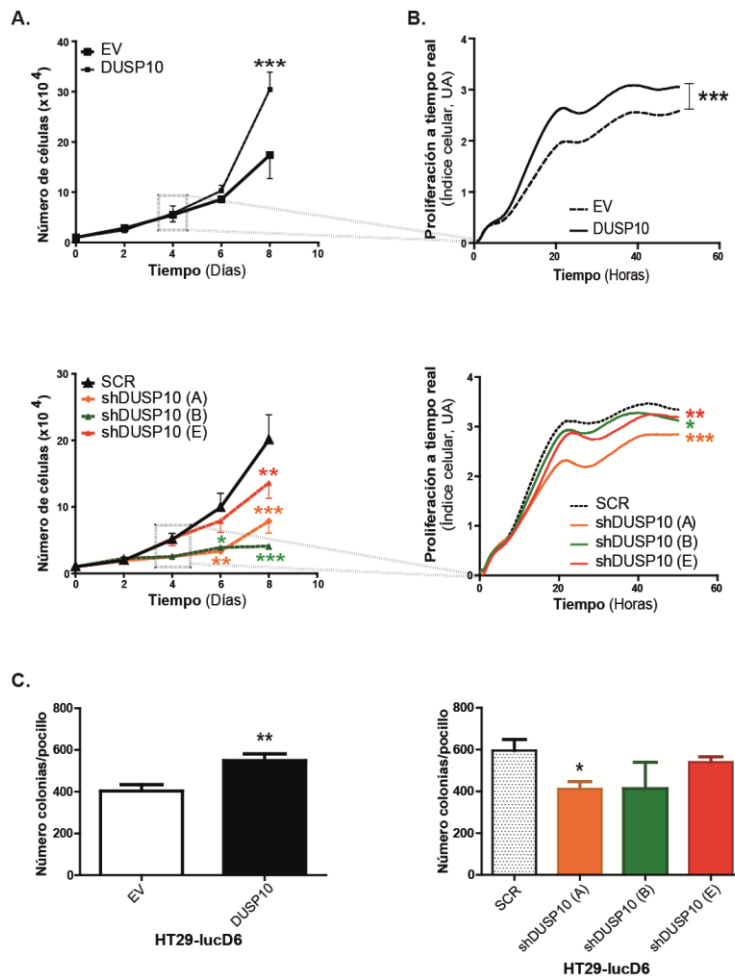


Figura R-6. DUSP10 promueve la proliferación celular. (A) Contaje celular de las líneas HT29 generadas utilizando una cámara de Neubauer y siguiendo cada dos días su crecimiento celular a partir de 10.000 células cultivadas a día 0. Las gráficas representan la media \pm SEM de 8 experimentos independientes y se compara cada línea HT29-DUSP10 o HT29-shDUSP10 a su respectiva línea control en cada día experimental (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). **(B)** Monitorización durante 50 h de 50.000 células cultivadas inicialmente mediante el sistema xCELLigence. Los gráficos pertenecen a un experimento representativo mostrándose las medias \pm SD intra-experimental y la proliferación se representa como índice celular siendo unidades arbitrarias (UA). **(C)** Cuantificación del número de colonias formadas a los 8 días tras el cultivo inicial de 1.000 células. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes y se compara a la línea control en cada caso (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

2.3. DUSP10 regula el ciclo celular.

El análisis del ciclo celular de las líneas a las 24 h de su siembra mostró un 10.5% más de células en fase S y un 5.4% más de células en fase G2/M en la línea HT29-DUSP10 que en la línea HT29-EV. En el mismo sentido, la línea HT29-shDUSP10 (E) resultó en un 4% menos de células tanto en la fase S como en la fase G2/M al comparar con HT29-SCR. Sin embargo, la fase G0/G1 fue significativamente menor tanto en la línea sobreexpresada como silenciada para DUSP10 (**Figura R-7A**). Con el fin de estudiar las diferencias observadas en la fase S del ciclo entre las sobreexpresión y el silenciamiento de DUSP10, analizamos la capacidad de síntesis de ADN mediante la incorporación de timidina tritiada (timidina-³H) a diferentes tiempos. Encontramos una mayor incorporación de timidina-³H en las células que sobreexpresan DUSP10 en todos los tiempos analizados, mientras que dicha incorporación fue menor cuando DUSP10 estaba silenciado (**Figura R-7B**).

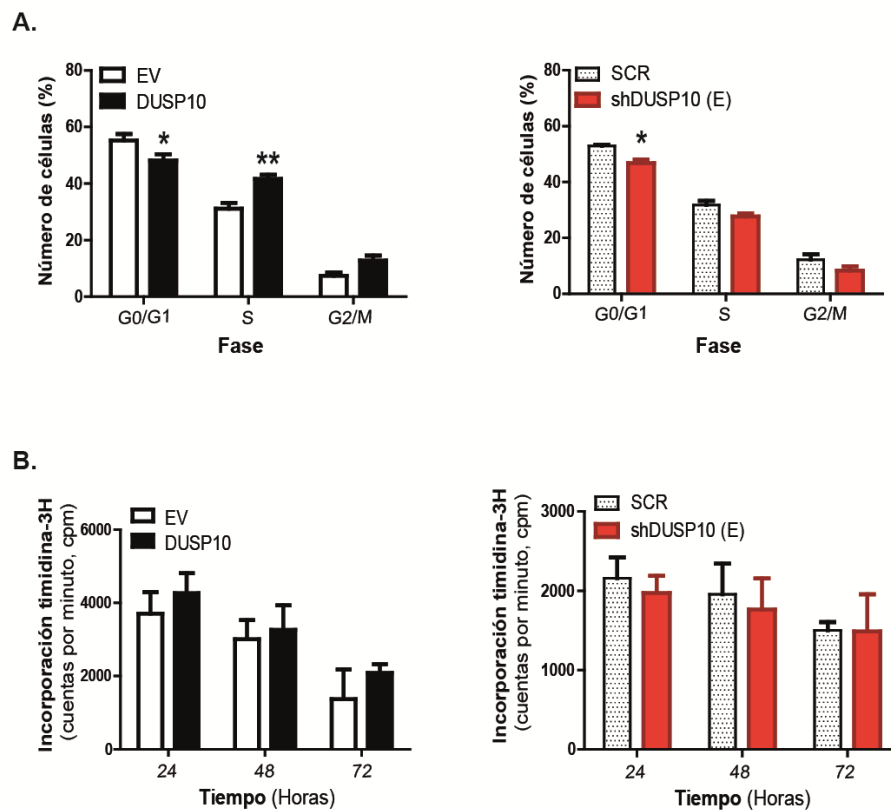


Figura R-7. La expresión de DUSP10 afecta el ciclo celular. (A) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en células HT29 control, sobreexpresadas o silenciadas para DUSP10 en crecimiento exponencial. Se representa en porcentaje el número total de células situadas en cada fase del ciclo. Se muestra la media \pm SEM de 5 experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **(B)** Análisis de la síntesis de ADN a las 24, 48 y 72 h en las líneas HT29-lucD6 sobreexpresando y silenciando DUSP10 mediante la incorporación de timidina tritiada (timidina-³H). Se miden las cuentas por minuto (cpm) de 3 experimentos independientes y se representa la media \pm SEM.

3. DUSP10 promueve la evasión de la inhibición por contacto a través de YAP1.

Los resultados previos mostraban que las diferencias en proliferación eran más evidentes cuando las células llegaban a una mínima densidad celular favorecida por su característico crecimiento en colonias. Este hecho, nos hizo plantearnos si la ventaja proliferativa dada por la sobreexpresión de DUSP10 estaría relacionada con la capacidad de las células epiteliales tumorales a alcanzar densidades más altas que las líneas silenciadas. La densidad celular y, por tanto, el contacto celular es una señal clave que promueve respuestas relacionadas con la inhibición de la proliferación (Abercrombie, 1979). En la inhibición por contacto de la proliferación, la ruta Hippo a través de su proteína principal YAP1 juega un papel fundamental regulando dichas señales (Zhao et al., 2007).

3.1. La alta densidad celular induce la expresión de *DUSP10* y *YAP1*.

Decidimos estudiar el efecto y la respuesta ante el contacto celular en varias líneas de CCR y su posible relación con la expresión de DUSP10 y YAP1, esta última proteína reguladora de la respuesta al contacto celular. Para ello, las células mantenidas en confluencia durante 48 h lo denominamos condición de alta densidad (AD). Observamos como la expresión de DUSP10 en AD aumentó significativamente 4 veces con respecto a la condición control en baja densidad (BD) en la línea HT29. De la misma manera, vimos como los niveles de *YAP1* aumentaron 1.5 veces en AD comparando con BD, al igual que sus genes diana, *CYR61* y *CTGF*, cuya expresión fue de 2 ($p=0.06$) y 2.5 ($p<0.001$) veces más, respectivamente (**Figura R-8A**). En células HCT116, la expresión de *DUSP10* y *YAP1* aumentó significativamente 12 veces y 6 veces, respectivamente, en AD en comparación con la BD (**Figura R-8B**). En células CACO2 en condiciones de AD, los niveles de *DUSP10* y *YAP1* aumentaron de manera significativa 4.8 y 2.3 veces, respectivamente. (**Figura R-8C**). La expresión de los genes diana *CYR61* y *CTGF* en las 2 últimas líneas celulares siguió un patrón distinto a HT29 no correlacionado con la inducción de *YAP1*.

3.2. La expresión de YAP1 en alta densidad en líneas de CCR depende de los niveles de DUSP10.

Los niveles de proteína de DUSP10 y YAP1 fueron estudiados en condiciones de BD y AD en las líneas celulares HT29, HCT116 y CACO2. Además, se generó una línea HCT116 que expresara de forma estable DUSP10, de tal manera, que pudo ser utilizada en paralelo con la línea HT29 que también sobreexpresaba dicho gen.

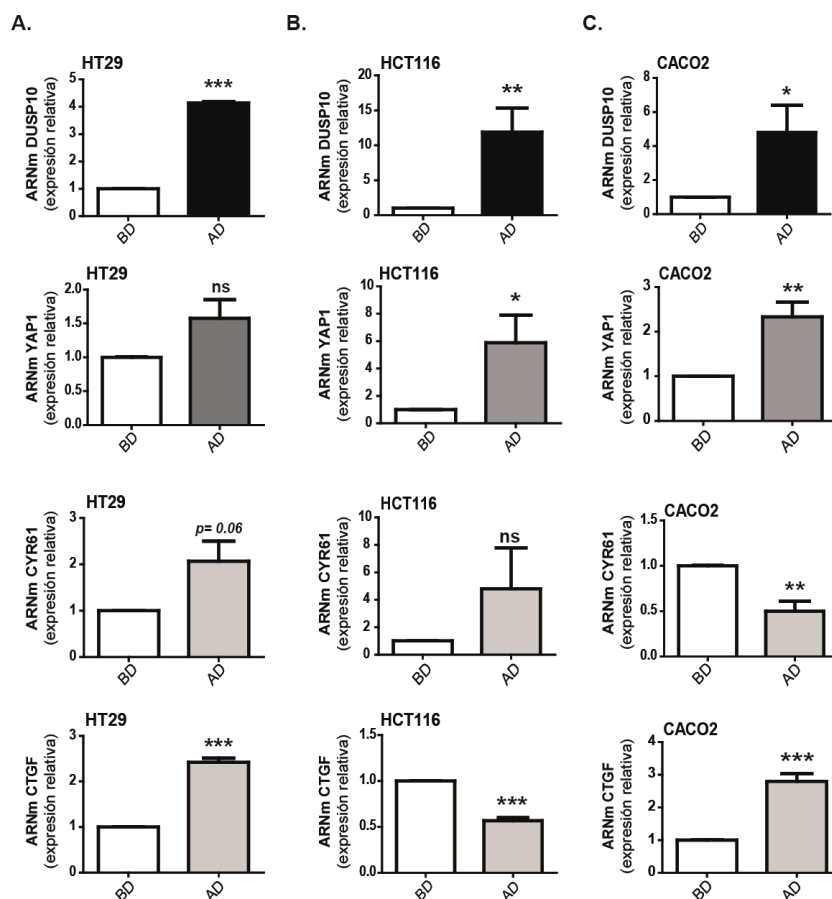


Figura R-8. La densidad celular induce la expresión de DUSP10 y YAP1 en líneas celulares de CCR. Análisis por RT-qPCR de los niveles de mRNA de DUSP10 y YAP1, y los genes diana de YAP1, CYR61 y CTGF **(A)** en la línea celular HT29, **(B)** HCT116 y **(C)** CACO2 en condiciones de baja densidad (BD) y alta densidad (AD) celular. Se normaliza con respecto a un gen control endógeno GAPDH y se compara a la condición control (BD). En todos los casos los datos son resultado de mínimo 3 experimentos independientes, representándose la media \pm SEM (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns= no significativo).

Analizando la línea HT29-lucD6, DUSP10 se indujo de forma significativa en HT29-EV en AD, sin variar su nivel de expresión en las células en las que ya se encontraba sobreexpresado DUSP10. La elevada expresión de DUSP10 correspondió con un aumento significativo en la desfosforilación de p38, siendo mayor en AD **(Figura R-9A)**. De la misma forma, vimos como los niveles de YAP1 se incrementaron significativamente en la línea HT29-EV en AD, y se encontraron aumentados en ambas condiciones al sobreexpresar DUSP10. Al mismo tiempo, detectamos el residuo Ser127 de YAP1 (p-YAP¹²⁷) significativamente más fosforilado en AD en ambas líneas celulares, y más fosforilado en HT29-DUSP10 respecto a HT29-EV en BD **(Figura R-9B)**. En la línea HCT116, pudimos observar resultados similares a los obtenidos en HT29. Un aumento significativo de la expresión de DUSP10 en AD con respecto a BD se encontró en las células HCT116-EV y en ambas condiciones en HCT116-DUSP10. Asimismo, los niveles de desfosforilación de p38 fueron mayores en AD y al sobreexpresar DUSP10

(Figura R-9C). También, observamos que la expresión de YAP1 aumentó significativamente en AD con respecto a BD en la línea HCT116-EV, y dicho aumento fue mayor en HCT116-DUSP10 en ambas condiciones. En el mismo sentido, p-YAP¹²⁷ fue significativamente mayor en AD en ambas líneas, aunque más elevado en ambas condiciones al sobreexpresar DUSP10 (Figura R-9D). Sin embargo, a diferencia con lo observado en las dos líneas anteriores, vimos que los niveles de expresión de DUSP10 en células CACO2 no variaron en AD con respecto a BD. Por el contrario, sí pudimos observar como los niveles de p-p38 disminuyeron significativamente en AD (Figura R-9E). En esta línea, la expresión de YAP1 disminuyó en AD e incrementó p-YAP¹²⁷ (Figura R-9F).

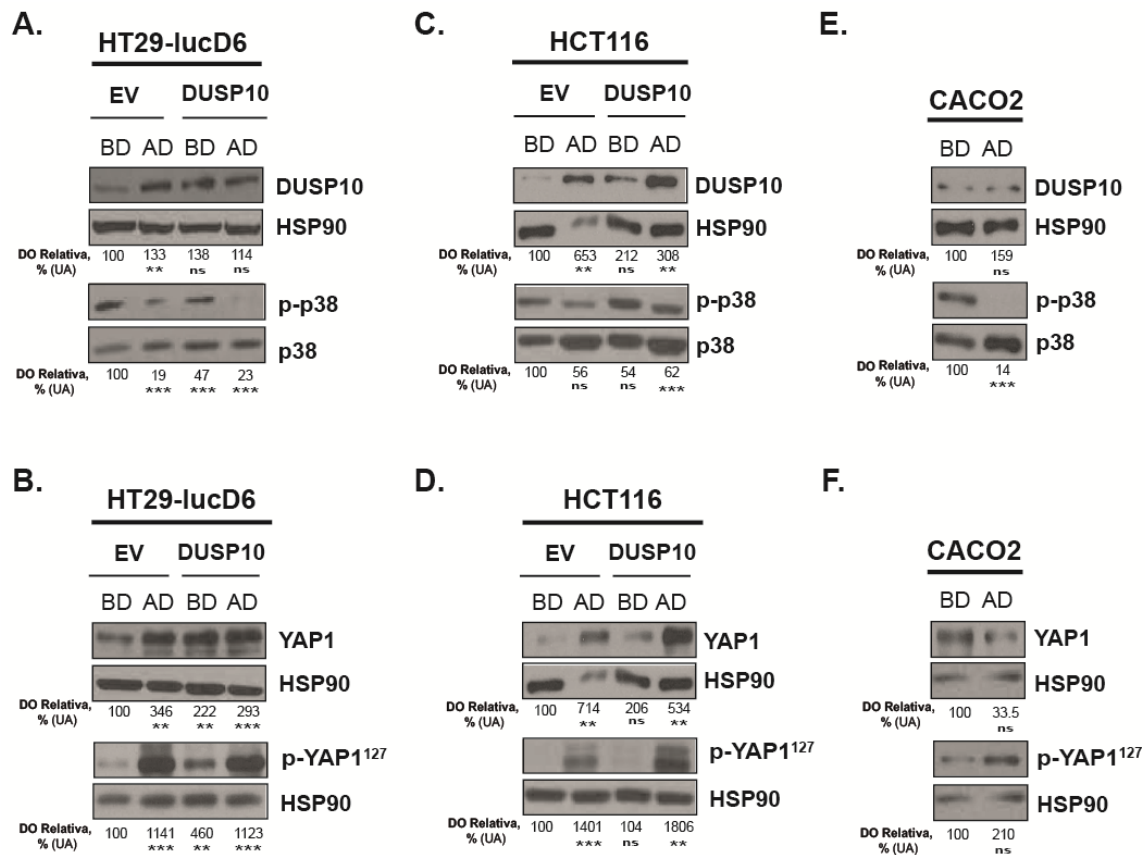
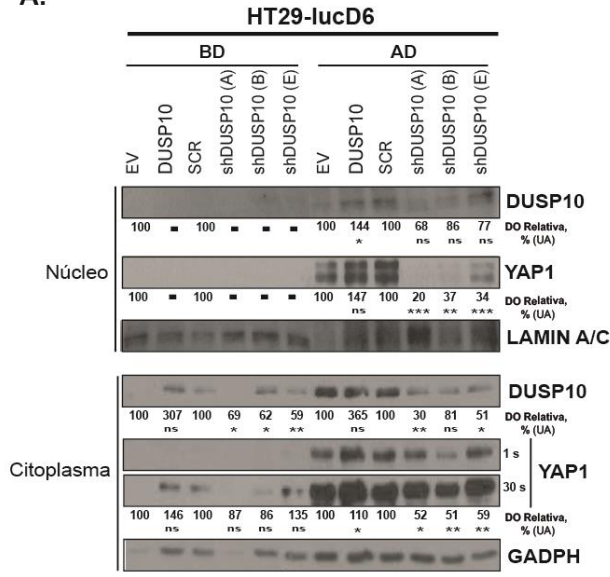


Figura R-9. La alta densidad induce DUSP10 y YAP1 en líneas celulares de CCR. (A) Análisis de los niveles de proteína de DUSP10, p-p38 y p38 en las líneas HT29-EV y HT29-DUSP10 en condiciones de BD y AD por WB. (B) Análisis de la proteína YAP1 y su fosforilación en el residuo Ser127 (p-YAP¹²⁷) en las líneas HT29-EV y HT29-DUSP10 en condiciones de BD y AD. (C) Análisis de los niveles de proteína de DUSP10, p-p38 y p38 en las líneas HCT116-EV y HCT116-DUSP10 en condiciones de BD y AD por WB. (D) Análisis de las proteínas YAP1 y p-YAP¹²⁷ en las líneas HCT116-EV y HCT116-DUSP10 en condiciones de BD y AD por WB. (E) Análisis de los niveles de proteína de DUSP10, p-p38 y p38 en la línea CACO2 en condiciones de BD y AD por WB. (F) Análisis de las proteínas YAP1 y p-YAP¹²⁷ en la línea CACO2 en condiciones de BD y AD por WB. En todos los casos se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. La cuantificación que aparece bajo los geles representa la media normalizada con respecto a la línea control (EV) en la condición de BD (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ns=no significativo). En el caso de proteínas fosforiladas se normaliza con respecto a la cantidad de proteína total, mientras que el resto de proteínas se normalizan con respecto al control de carga HSP90.

3.3. DUSP10 y YAP1 se translocan al núcleo en alta densidad celular.

Como se ha mencionado en la introducción, YAP1 desfosforilada es capaz de pasar al núcleo y, mediante su unión a la familia de factores de transcripción TEAD, activar la transcripción de genes. En células no tumorales, la BD promueve la presencia de YAP1 en el núcleo, lo contrario que ocurre en AD. Con el fin de estudiar este hecho en células tumorales, analizamos la localización en el citoplasma y núcleo de DUSP10 y YAP1 en las líneas HT29-lucD6 sobreexpresando o silenciando DUSP10. En los extractos celulares en BD no se detectó en ningún caso DUSP10 y YAP1, únicamente se detectaron dichas proteínas en los extractos citoplásmicos. En el citoplasma en BD, los niveles de YAP1 se correspondieron con los niveles de expresión de DUSP10, siendo mayores cuando ésta estaba sobreexpresada y viceversa. En AD, las proteínas DUSP10 y YAP1 sí pudieron ser detectadas en los extractos nucleares, siendo mayor la expresión de YAP1 cuando DUSP10 estaba sobreexpresado y significativamente menor cuando DUSP10 estaba silenciado. En el citoplasma en AD, los niveles de expresión YAP1 se correspondieron con los niveles de DUSP10 (**Figura R-10A**). A continuación, nos planteamos si la movilización observada de DUSP10 y YAP1 podría estar relacionada con los niveles de p-YAP¹²⁷. Observamos como la sobreexpresión de DUSP10 llevaba asociada un aumento de p-YAP¹²⁷ en los extractos citoplásmicos con respecto a la línea control en BD. Por el contrario, el silenciamiento de DUSP10 en BD en el citoplasma correspondió con más proteína hiperfosforilada (detectado por un bandeo más elevado). Cuando los extractos se analizaron en AD, los niveles de p-YAP¹²⁷ aumentaron en todas las líneas celulares con respecto a BD. Sin embargo, observamos como las líneas HT29-shDUSP10 tuvieron una mayor hiperfosforilación en comparación con la línea HT29-SCR. Al mismo tiempo, observamos como en los extractos nucleares sólo se detectó p-YAP¹²⁷ en BD en las líneas HT29-shDUSP10. Sin embargo, en AD se detectaron niveles altos de p-YAP¹²⁷ correlacionando de forma directa con los niveles de expresión de DUSP10 (**Figura R-10B**).

A.



B.

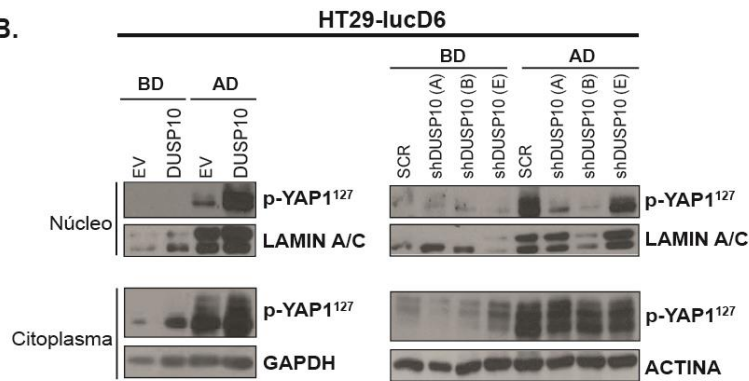


Figura R-10. Translocación de DUSP10 y YAP1 del citoplasma al núcleo en AD en células HT29-lucD6. (A) Análisis de extractos nucleares y citoplásmicos de la línea HT29-lucD6 sobreexpresando (HT29-DUSP10) y silenciando DUSP10 (HT29-shDUSP10) en condiciones de BD y AD para las proteínas DUSP10 y YAP1 (exponiendo 1 s o 30 s) por WB. (B) Análisis de la proteína p-YAP¹²⁷ en extractos citoplásmicos y nucleares en las líneas HT29-lucD6 generadas por WB. En todos los casos se muestra un experimento representativo y los números que aparecen bajo los geles muestran la media de 3 experimentos independientes, comparando con la línea control (EV/SCR) en cada condición (AD/BD) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo; ■ =no se detecta). La normalización de la cantidad de proteína es respecto a la actina o GAPDH para los extractos citoplásmicos y lamin A/C para los nucleares.

3.4. La localización subcelular de DUSP10 y YAP1 depende de la densidad celular y la línea celular.

Analizamos tres líneas diferentes: la línea HT29 ya mencionada, la línea CACO2 por su comportamiento distinto en la expresión de DUSP10 y la línea 3T3 como “modelo” de estudio de la ruta Hippo en la inhibición de la proliferación por contacto en mamíferos. En la línea 3T3 detectamos en BD la presencia de DUSP10 y YAP1 mayoritariamente en los núcleos de la célula. Sin embargo, cuando las células llegaron a AD observamos como ambas proteínas se localizaron preferentemente en el citoplasma (**Figura R-11A**). En la línea CACO2, por el contrario, las proteínas DUSP10 y YAP1 se detectaron en el núcleo de las células independiente de la densidad celular (**Figura R-11-B**). Las células HT29 en BD expresaron DUSP10 y YAP1 tanto en el núcleo como en el citoplasma celular variando la cantidad y localización de proteína en función de la célula analizada. Sin embargo, YAP1 permaneció en el núcleo de muchas células tanto en BD como en AD (**Figura R-11C**).

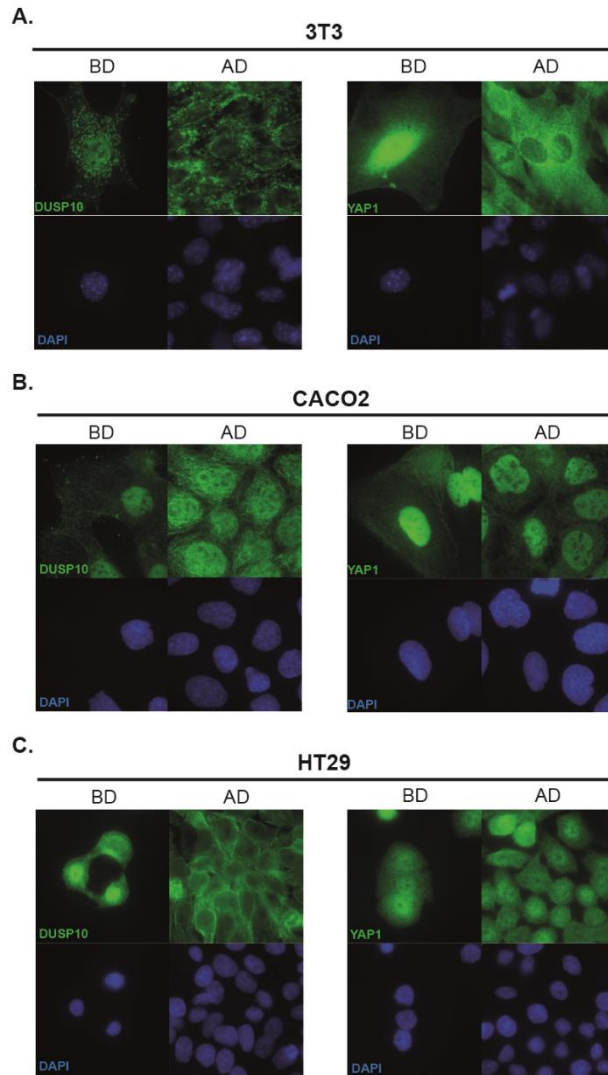


Figura R-11. Localización subcelular de DUSP10 y YAP1 en función de la densidad celular. Detección de DUSP10 (panel izquierdo) y YAP1 (panel derecho) en condiciones de baja (BD) y alta densidad (AD) en las células **(A)** 3T3, **(B)** CACO2 y **(C)** HT29. Las imágenes corresponden a un campo representativo.

3.5. YAP1 interacciona con DUSP10 y p38 en condiciones de alta densidad.

Nos planteamos si DUSP10 y YAP1 podrían estar interaccionando en AD. Para ello, utilizamos las células HT29 y HCT116 que sobreexpresan DUSP10 con diferente eficiencia, mayor expresión en HCT116 que en HT29. Mantuvimos las líneas en cultivo en AD durante 48 h e inmunoprecipitamos con el anticuerpo anti-YAP1. Observamos como YAP1 co-precipitó DUSP10 y p38 tanto en la línea HT29-DUSP10 (**Figura R-12A**) como en la línea HCT116-DUSP10 (**Figura R-12B**), indicando una interacción física entre la proteína YAP1 con las proteínas DUSP10 y p38 en condiciones de AD. Al mismo tiempo, detectamos DUSP10 y YAP1 simultáneamente en las líneas HT29-DUSP10 (**Figura R-12C**) y HCT116-DUSP10 (**Figura R-12D**), y vimos que ambas proteínas se localizaban simultáneamente en el mismo lugar en la célula.

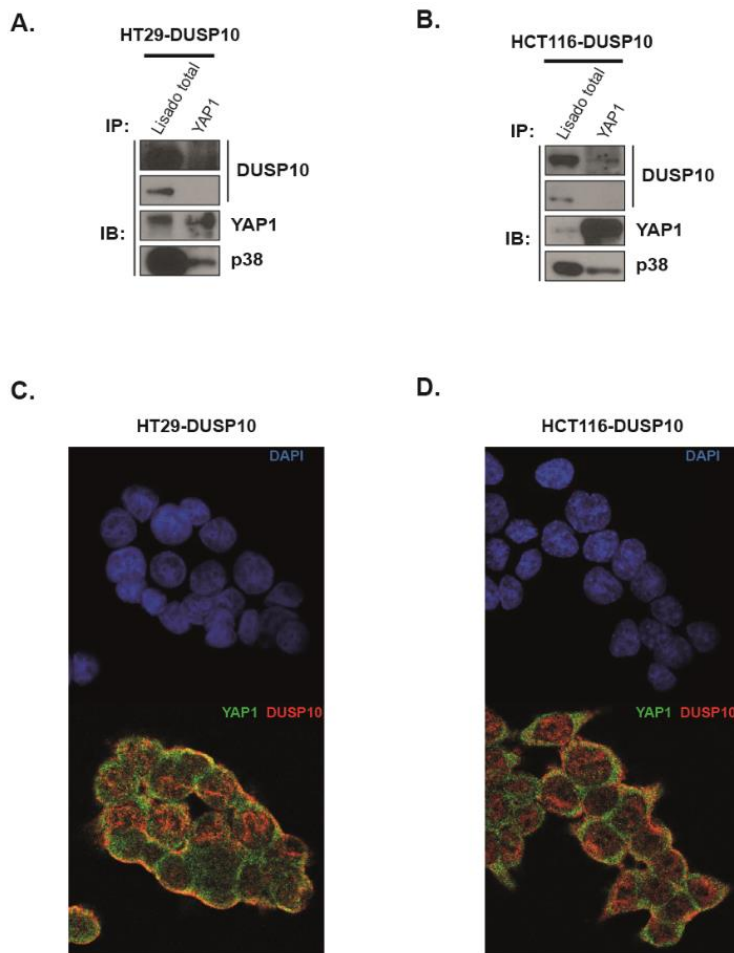


Figura R-12. Interacción proteica de YAP1 con DUSP10 y p38 en HT29 y HCT116. Detección por WB las proteínas DUSP10, p38 y YAP1 en una inmunoprecipitación (IP) realizada con anti-YAP1 en lisados de línea **(A)** HT29-DUSP10 y **(B)** HCT116-DUSP10 en condiciones de AD. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes. Se utilizó el lisado total previo a la IP como control positivo de las proteínas. Localización simultánea de DUSP10 (rojo) y YAP1 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en el cultivo celular de **(C)** HT29-DUSP10 y **(D)** HCT116-DUSP10. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

3.6. La inhibición de YAP1 y p38 altera la proliferación en las líneas celulares de CCR.

Con la finalidad de estudiar la relación de la proliferación con la elevada expresión de DUSP10 y YAP1 en AD, utilizamos inhibidores específicos para regular la actividad de p38 y YAP1. El SB239063 (SB) es un inhibidor de la fosforilación de p38 ($\alpha/\beta/\gamma$) (Barone et al., 2001) y se utilizó con el fin de mimetizar la actividad fosfatasa de DUSP10. Por otro lado, el compuesto verteporfina (VP), un inhibidor de la interacción de YAP1 con los co-factores transcripcionales TEAD (Wang et al., 2016), se utilizó para estudiar la respuesta de nuestras líneas celulares al inhibir la señalización mediada por YAP.

El seguimiento de proliferación a tiempo real mostró cómo las células tanto HT29 y HCT116 proliferaron significativamente más tras el tratamiento con el inhibidor SB en comparación con el tratamiento control con DMSO (**Figura R-13A y R-13B**). Por el contrario, el uso del inhibidor SB sobre la línea CACO2 no mostró ninguna diferencia en proliferación con respecto al tratamiento con DMSO (**Figura R-13C**). Sin embargo, cuando tratamos las tres líneas celulares con el inhibidor VP, vimos como el tratamiento disminuyó significativamente la proliferación celular con respecto al tratamiento con DMSO.

Los niveles de DUSP10, YAP1 y p-YAP¹²⁷, p38 y p-p38 se analizaron en las tres líneas celulares con ambos inhibidores en la fase de mayor diferencia observada en la proliferación a tiempo real (línea punteada en la figura R-13A, R-13B y R-13C). La detección de estas proteínas en la línea HT29 mostró que el tratamiento con SB aumentó la expresión de DUSP10, YAP1, p-YAP¹²⁷ y p-p38 con respecto al tratamiento control. Al contrario a lo observado con el inhibidor SB, el tratamiento con VP disminuyó tanto los niveles de proteína DUSP10 como YAP1 y p-YAP¹²⁷, mientras que los niveles de p-p38 incrementaron (**Figura R-13D**). Las líneas HCT116 tratadas con el inhibidor SB mostraron niveles parecidos de DUSP10, YAP1 y p-YAP¹²⁷, mientras que hubo más p38 fosforilada respecto al tratamiento con DMSO. De igual modo que en la línea HT29, el tratamiento con VP disminuyó los niveles de DUSP10, YAP1 y p-YAP¹²⁷, mientras que los niveles de p-p38 fueron mayores (**Figura R-13E**). Finalmente, la línea CACO2 mostró de nuevo un comportamiento distinto al resto de líneas, al no detectar expresión de DUSP10 en ninguna condición. La expresión de YAP1 tras el tratamiento con los inhibidores no varió, aunque sí observamos una disminución de los niveles de p-YAP¹²⁷ con SB y VP respecto al tratamiento con DMSO. Además, fue el unico caso en que los niveles de p-p38 disminuyeron con el inhibidor SB, mientras que como el resto de líneas aumentó con el inhibidor VP (**Figura R-13F**).

3.7. *DUSP10* regula los niveles de *CDH1* en condiciones de AD.

Se ha descrito como la densidad celular genera una respuesta mecánica en el contacto célula-célula transducida por una diversidad de proteínas de respuestas celulares (Low et al., 2014). Una de dichas proteínas iniciadoras de la cascada es la E-cadherina (E-CDH), que actuaría como sensor y activaría la ruta Hippo (Benham-Pyle et al., 2015). En este sentido, nos planteamos si las líneas de CCR estarían respondiendo a la densidad celular a través de YAP, activando la vía E-CDH, y si dicha señalización podría estar dependiendo de la expresión de DUSP10. Para ello, utilizamos las líneas HT29-DUSP10 y HT29-shDUSP10 en condiciones de BD y AD.

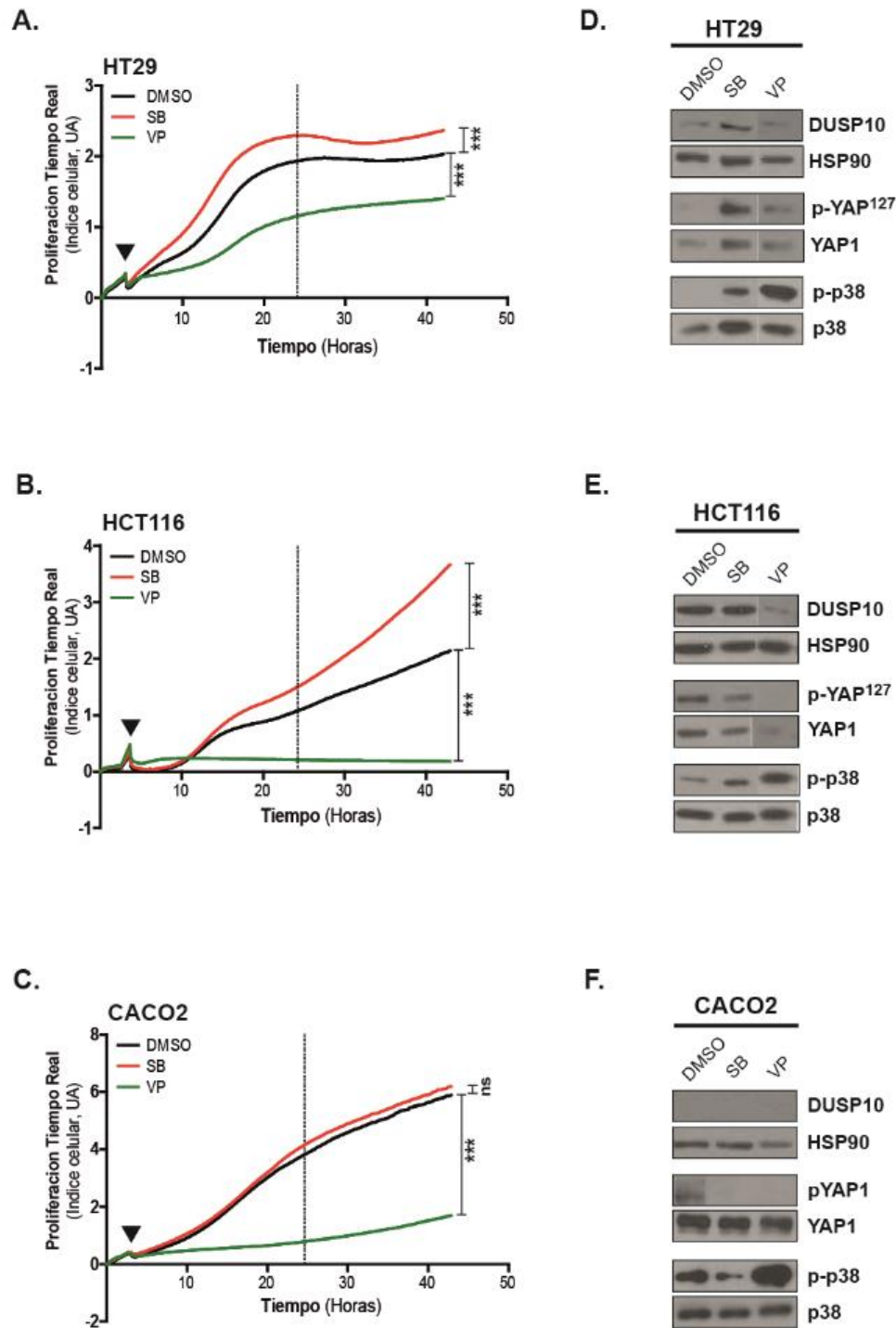


Figura R-13. La inhibición de p38 y YAP1 reguló la proliferación celular de manera diferencial en las líneas de CCR. Monitorización de la proliferación de las células **(A)** HT29, **(B)** HCT116 y **(C)** CACO2 durante 42 h midiendo el índice celular a tiempo real mediante el sistema xCELLigence. Se cultivaron 3×10^4 células HCT116 y 5×10^4 células CACO2 y HT29 por pocillo para ser tratadas a las 3 h post-siembra (\blacktriangledown) con el inhibidor de p38 SB239063 (SB, 1 μ M) y el inhibidor de YAP verteporfina (VP, 1 μ M). Se comparan los tratamientos respecto al control con DMSO (** $p < 0.001$; ns= no significativo). La línea punteada muestra el punto de 24 h donde se analizan los niveles de proteína. Detección por WB de las proteínas DUSP10, YAP1, p-YAP¹²⁷, p38 y p-p38 en las células **(D)** HT29, **(E)** HCT116 y **(F)** CACO2 tras tratar con SB y VP durante 24 h. En todos los casos se muestra un experimento representativo de 3 independientes.

La expresión de *DUSP10* aumentó significativamente en AD en la línea HT29-EV con respecto a BD y, como ya se había observado, éste aumento de *DUSP10* en AD fue significativamente mayor en la línea que ya sobreexpresa *DUSP10* (**Figura R-14A**). Como se esperaba, la línea HT29-sh*DUSP10* (E) mostró un significativo 87% menos de expresión de *DUSP10* en condiciones de BD, manteniendo dicha expresión significativamente baja con respecto a la línea HT29-SCR en AD (**Figura R-14B**). Confirmamos que la AD aumentó también la expresión de la proteína E-CDH en la línea HT29 (**Figura R-14C**). En las mismas líneas celulares y condiciones, vimos que los niveles de expresión de *CDH1*, gen que codifica para la proteína E-CDH, no variaron en BD entre las líneas HT29-*DUSP10* y HT29-EV. Sin embargo, vimos como la expresión de *CDH1* aumentó significativamente 3.7 veces en la línea HT29-EV en AD con respecto a BD, y esta inducción fue aún mayor en HT29-*DUSP10* (**Figura R-14D**). Por el contrario, la expresión de *CDH1* en la línea HT29-sh*DUSP10* (E) fue significativamente menor en comparación con HT29-SCR en BD, y esta inducción fue aún significativamente menor en HT29-sh*DUSP10* (E) (**Figura R-14E**).

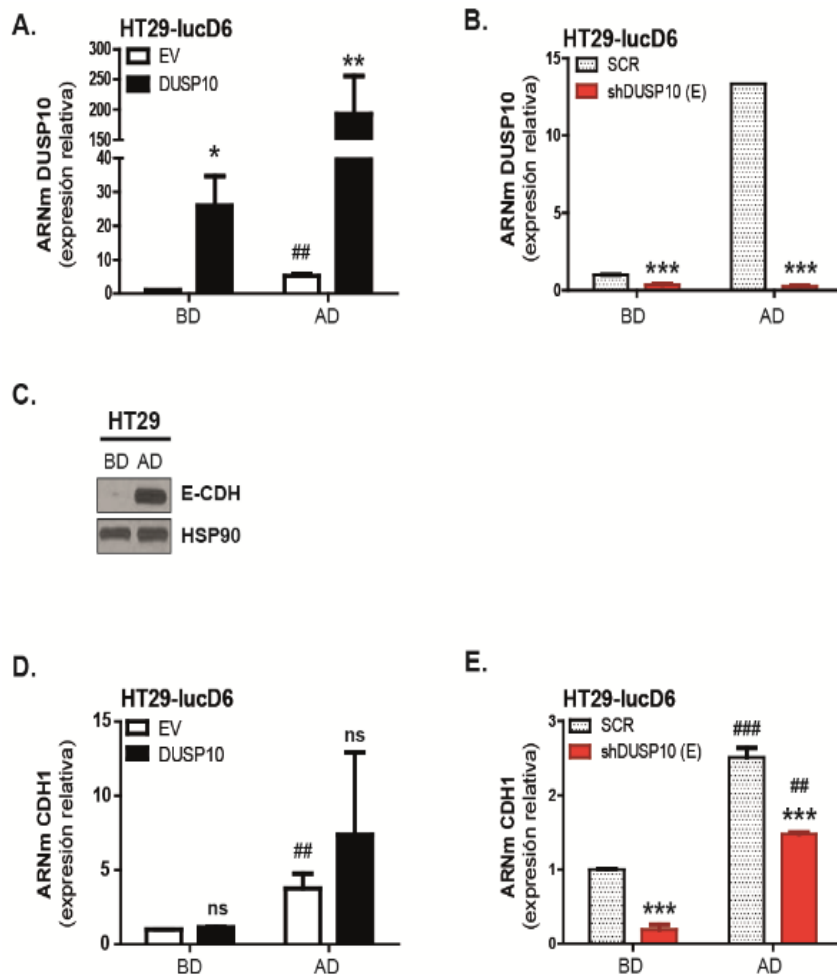


Figura R-14. Inducción de E-cadherina dependiente de *DUSP10* en AD en la línea HT29. (A-B) Análisis de los niveles de expresión de *DUSP10* por RT-qPCR en las líneas HT29-*DUSP10* y HT29-sh*DUSP10* (E) y las líneas control HT29-EV y HT29-SCR en BD y AD. (C) La expresión de la proteína E-cadherina (E-CDH) fue estudiada por WB en la línea HT29 en BD y AD. (D-E) Análisis por ARNm del gen *CDH1* mediante RT-qPCR en las líneas HT29-*DUSP10* y HT29-sh*DUSP10* (E) y respectivas líneas control HT29-EV y HT29-SCR en BD y AD. Se utilizó el gen *HPRT* como gen de referencia. Se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes y se normaliza entre líneas dentro de cada condición (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo) y entre condiciones dentro de cada línea (## $p < 0.05$; ### $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; ns=no significativo).

3.8. Alteraciones en el ciclo celular en AD dependen de la expresión de DUSP10.

Dado que los resultados mostrados anteriormente indicaban que la expresión de DUSP10 influye en la regulación del ciclo celular, al igual que lo hace el contacto celular, quisimos estudiar si la AD estaría regulando el ciclo celular en función de la expresión de DUSP10. Al analizar las fases del ciclo en la línea HT29-EV observamos como la AD causó, como era de esperar, un aumento significativo (10.8%) del número de células en fase G0/G1, mientras que disminuyó significativamente (8.8%) el número de células detectadas en fase S, al mismo tiempo que no se encontraron diferencias en la fase G2/M (Figura R-15A). En HT29-DUSP10, también encontramos de manera significativa menos células en fase S (12.3%) en AD, aunque en esta línea no hubo diferencias en la fase G0/G1 y en la fase G2/M (Figura R-15B). La línea control HT29-SCR se comportó de igual forma que la línea HT29-EV, ya que se detectó un incremento significativo (9.5%) de células en fase G0/G1, una disminución significativa (7.5%) de la fase S y sin diferencias en la fase G2/M entre AD y BD (Figura R-15C). La línea HT29-shDUSP10, de modo similar a HT29-SCR, incrementó significativamente (10.8%) el número de células en G0/G1. Sin embargo, en las fases S y G0/G1 no se encontraron diferencias, aunque sus porcentajes fueron menores (Figura R-15D).

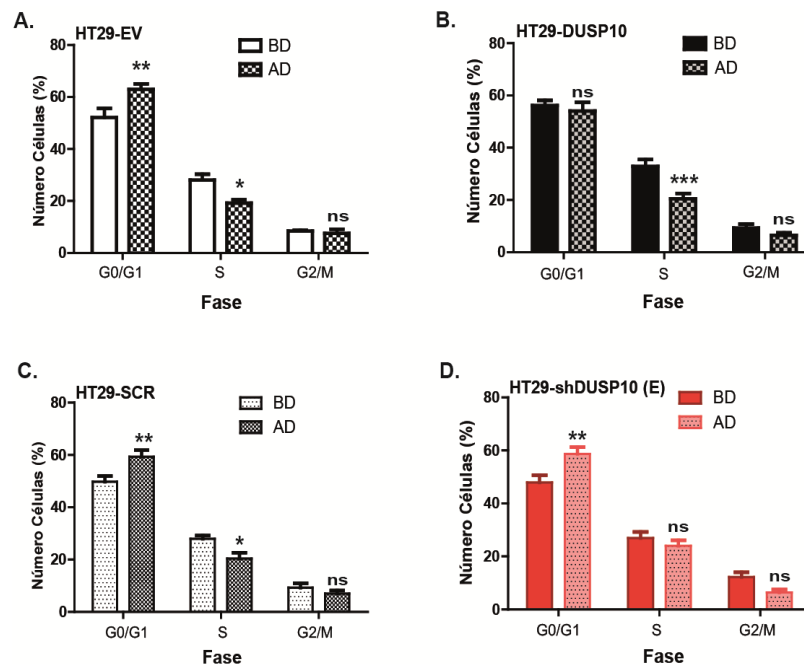


Figura R-15. Regulación de la fase G0/G1 del ciclo celular en AD por la expresión de DUSP10. Análisis de las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) por citometría de flujo mediante el marcaje con yoduro de propidio de las líneas (A) HT29-EV (B) HT29-DUSP10 (C) HT29-SCR y (D) HT29-shDUSP10 (E) en condiciones de BD y AD. Se representa la media \pm SEM de 6 experimentos independientes en porcentaje de número de células y se compara la AD respecto a la BD en cada fase del ciclo (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo).

3.9. DUSP10 regula las proteínas de ciclo celular en respuesta a la densidad celular.

Las células regulan su ciclo celular a través de proteínas específicas. Estas proteínas de ciclo son kinasas dependientes de ciclina (CDK) y están implicadas en el control de cada fase del ciclo. Además, las proteínas ciclinas se encargan de la activación de las CDK formando complejos CDK-ciclinas, mientras que las proteínas inhibidoras cumplen el papel de regular negativamente a las ciclinas (MacLachlan et al., 1995). Nos planteamos si el efecto de DUSP10 en la fase G0/G1 se debía a modificaciones en la expresión de las proteínas CDK y ciclinas implicadas en las fases G1 y S del ciclo celular. Utilizando las líneas HT29 sobreexpresando o silenciando DUSP10 en condiciones de BD y AD, analizamos algunas de dichas proteínas. Primero, comprobamos como la línea celular HT29 era capaz de responder a la AD analizando los niveles de fosforilación de ERK (Li et al., 2004). Vimos que los niveles de fosforilación de ERK fueron menores en AD en comparación a BD tanto en la línea HT29-DUSP10 como en HT29-EV (**Figura R-16A**). Lo mismo ocurrió en las líneas HT29-shDUSP10 y HT29-SCR donde hubo una disminución de ERK fosforilada en AD con respecto a BD (**Figura R-16B**). En ningún caso, observamos diferencias significativas en la fosforilación de ERK dependientes de la expresión de DUSP10 en BD y AD.

Las proteínas CDK6 y CDK2 se expresaron más en HT29-EV en AD. Sin embargo, este aumento fue mayor para CDK6 pero no para CDK2 en HT29-DUSP10, debido a que DUSP10 fue un excelente inductor de CDK2 ya en BD. Por el contrario, la expresión de la proteína CDK4 disminuyó alrededor de un 40% en AD tanto en HT29-EV como en HT29-DUSP10 (**Figura R-16C**). El aumento de la expresión de CDK6 en AD fue menor en las líneas HT29-shDUSP10 comparada con HT29-SCR. En HT29-shDUSP10 no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CDK4, probablemente debido a su baja expresión. La expresión de la proteína CDK2 en la línea HT29-shDUSP10 fue menor en condiciones de BD, en oposición a cuando se sobreexpresa, e incrementándose levemente en AD (**Figura R-16D**).

Analizamos los niveles de expresión de las ciclinas D1 y D3 como proteínas reguladas por las CDK. Además, estudiamos una proteína inhibidora de CDK (CKI), la proteína p21, que estaría regulando el complejo CDK-ciclina. La expresión de la ciclina D1 baja en AD y no parece afectarse por la sobreexpresión de DUSP10. Del mismo modo, los niveles de expresión de la ciclina D3 disminuyeron un 40-60% de manera independiente a la sobreexpresión de DUSP10 en AD. Finalmente, la expresión de p21 aumentó en AD en la línea HT29-EV pero apenas se pudo detectar en la línea HT29-DUSP10 (**Figura R-16E**). La ciclina D1 y la ciclina D3 mostraron una expresión levemente mayor en las líneas

HT29-shDUSP10 en comparación con HT29-SCR en BD. Sin embargo, la expresión de la ciclina D1 no disminuyó en AD en las líneas HT29-shDUSP10. Por el contrario, la expresión de la ciclina D3 disminuyó en AD independientemente del silenciamiento de DUSP10. Finalmente, observamos como los niveles de expresión de p21 no se detectaron en BD en ninguna línea HT29-shDUSP10, pero si aumentó la expresión de dicha proteína en AD aunque siendo este incremento siempre menor en las líneas HT29-shDUSP10 (**Figura R-16F**).

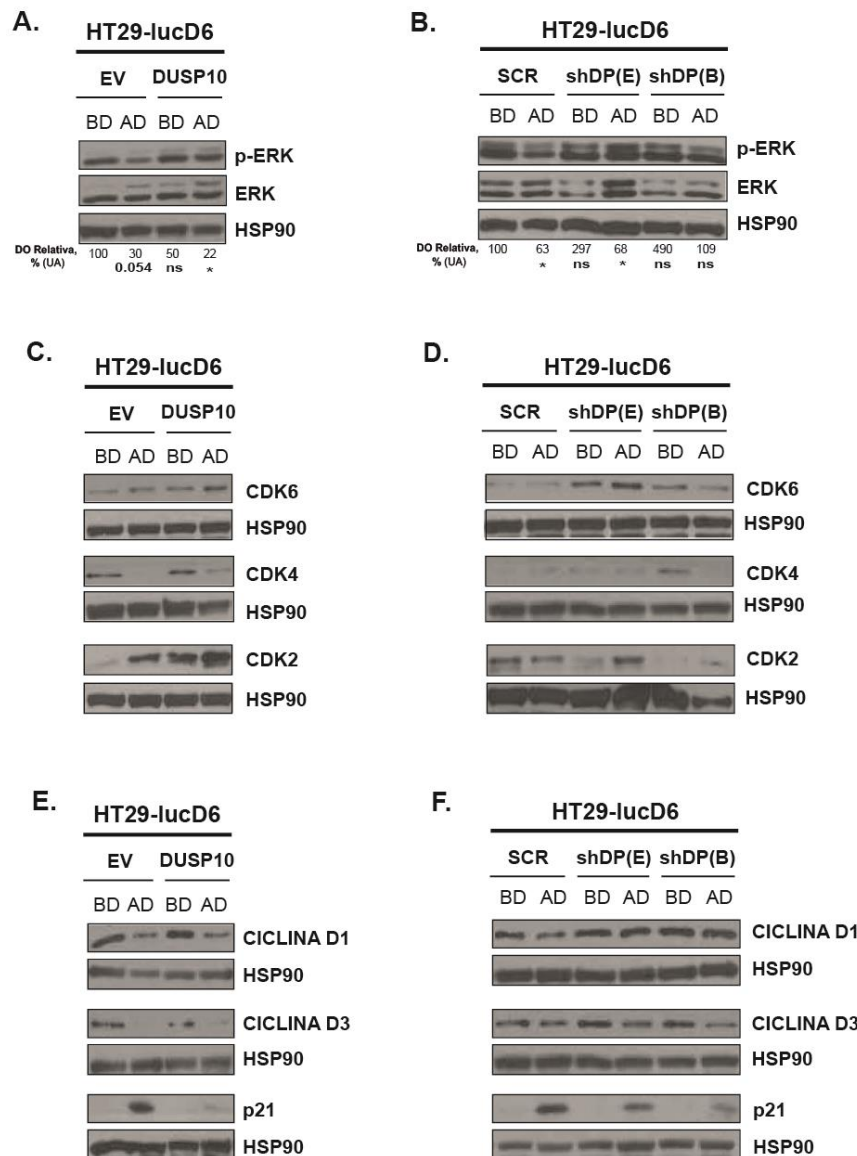


Figura R-16. Expresión de CDK, ciclinas y p21 dependientes de la expresión de DUSP10 y la densidad celular. (A, C, E) Análisis de la expresión de p-ERK y ERK, CDK6, CDK4 y CDK2, ciclina D1, D3 y p21 en la línea HT29 sobreexpresando DUSP10 (HT29-DUSP10) en condiciones de BD y AD mediante WB. (B, D, F) Análisis de la expresión de p-ERK y ERK, CDK6, CDK4 y CDK2, ciclina D1, D3 y p21 en la línea HT29 silenciando DUSP10 (HT29-shDP) en condiciones de BD y AD mediante WB. Se representa la media de 3 experimentos independientes y se normaliza con respecto a la línea control en condición de BD (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo).

4. Efecto de DUSP10 sobre la formación y el desarrollo tumoral en el cáncer de colon.

4.1. Estudio *in silico* de genes relacionados con PTGS2, DUSP10 y YAP1 en el CCR.

En primer lugar realizamos una búsqueda *in silico* de la expresión de *DUSP10* y de genes relacionados que podrían variar su expresión o estar mutados en pacientes con CCR. La plataforma *cBioPortal* (<http://cbioportal.org>) permite explorar, visualizar y analizar de manera multidimensional la genómica del cáncer (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013). Nos centramos en estudiar la expresión de 16 genes, alguno de ellos por ser clave en el desarrollo del CCR y otros por estar implicados en la ruta de COX, *DUSP10*, MAPK o en la ruta Hippo. Una cohorte de 212 muestras ya estudiada para la expresión génica, mutaciones y ácidos nucleicos circulantes (CNA, *Circulating Nucleic Acids*) nos sirvió de base para nuestro análisis (Cancer Genome Atlas, 2012). Lo primero observado en esta cohorte fue que los genes seleccionados para el estudio tuvieron alteraciones en 194 (92%) de 212 casos secuenciados/paciente, principalmente por mutaciones sin sentido, amplificaciones y deleciones. Cada gen contribuyó al total de la cohorte con porcentajes diferentes, siendo alguno de ellos genes de la ruta de PG, *DUSP10* o *YAP1* (**Figura R-17A**). Sin embargo, los casos que presentaron algunas de las alteraciones (n=192) en los genes de interés tuvieron una menor supervivencia ($p=0.568$) que los casos sin alteraciones (n=18) (**Figura R-17B**). Cuando estudiamos la asociación entre la presencia y/o ausencia de dichas alteraciones entre nuestros genes de interés en la cohorte de pacientes, observamos casos de coincidencia o exclusión significativa entre alguno de ellos en las muestras. Por ejemplo, las alteraciones en el gen *APC* fueron significativamente excluyentes con alteraciones en el gen *BRAF*, pero no con alteraciones en el gen *KRAS* donde son coincidentes en las muestras. Del mismo modo, identificamos como alteraciones en el gen *PTGS2* coincidieron de forma significativa con alteraciones en el gen *DUSP10* o con el gen *MAPK14*, aunque este último de manera no significativa. Otras muestras con alteraciones en *DUSP10* no coincidieron con alteraciones génicas en *APC*, pero sí con alteraciones en el gen *PTGER1*. Sin embargo, variaciones significativas en éste último coincidían significativamente con alteraciones en *YAP1* en las mismas muestras, a la vez que cambios casi significativos ($p=0.056$) en dicho gen coincidían con cambios en el gen *MAPK14* (**Figura R-17C**). En este estudio, los autores analizaron el nivel de expresión de ARNm de 19.000 genes mediante *RNA Seq* y lo expresaron como RPKM (*Read per Kilobase Million*). En consecuencia, en esta cohorte observamos una correlación entre los niveles de expresión de los genes *PTGS2* y *DUSP10* (R^2 de Pearson=0.40), *MAPK14* y *YAP1* (R^2 de Pearson=0.46) y *PTGFR* con *YAP1* (R^2 de Pearson=0.31). De la misma forma,

correlacionó la expresión de YAP1 con genes característicos del CCR como APC (R^2 de Pearson=0.37), BRAF (R^2 de Pearson=0.41) y KRAS (R^2 de Pearson=0.39) (Figura R-17D).

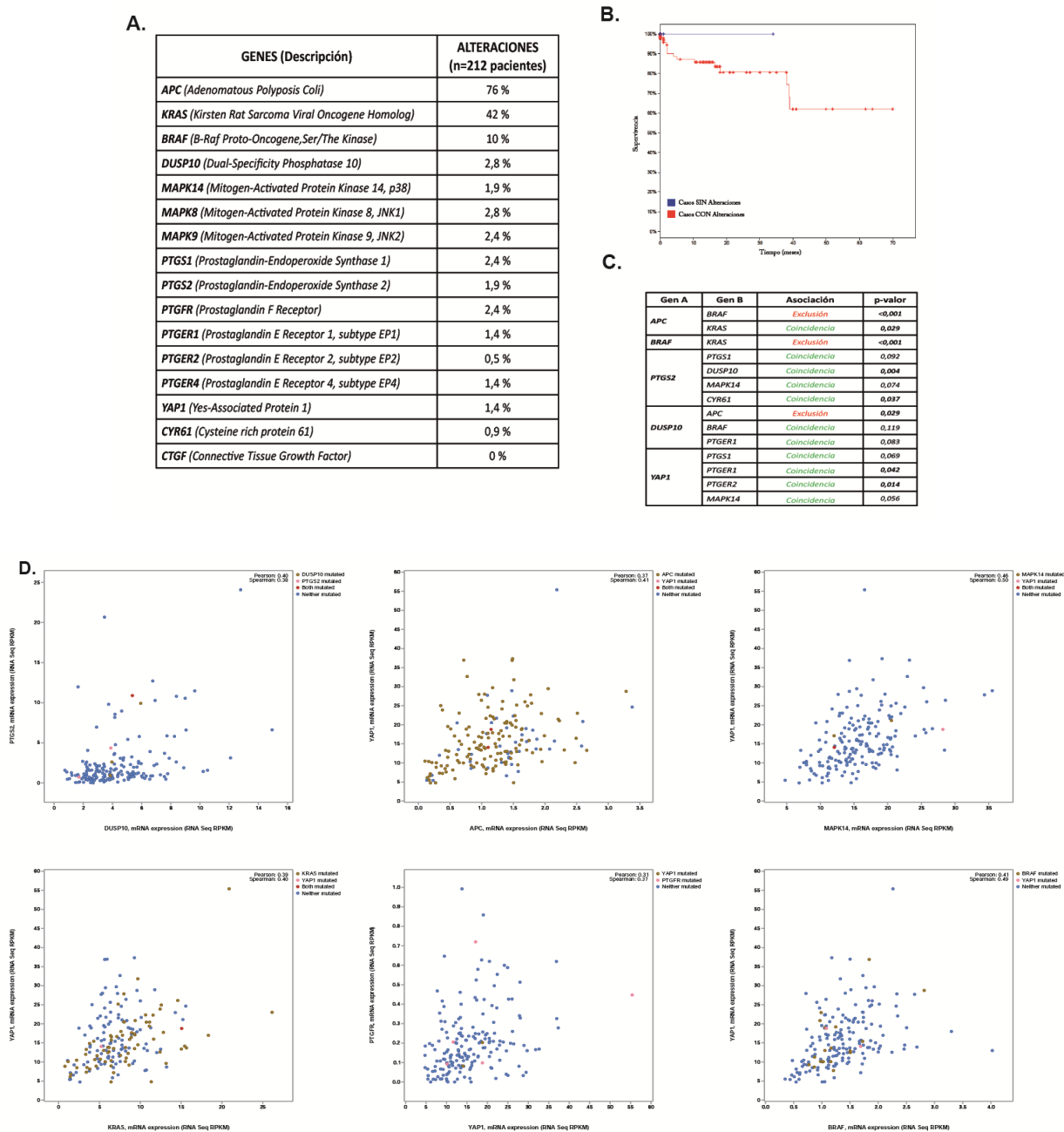


Figura R-17. Estudio in silico en cBioPortal de genes implicados en el CCR y relacionados con las rutas de PTGS2, DUSP10 y YAP1 (TCGA, Nature, 2012). (A) Determinación del porcentaje de tumores con alteraciones génicas para cada gen de interés analizado en un total de 212 muestras. (B) Curva de supervivencia (análisis de Kaplan-Meier) de casos sin alteraciones (curva azul) vs. con alteraciones (curva rojo) en el conjunto de genes seleccionados. (C) Análisis de asociación (test exacto de Fisher) de alteraciones génicas entre los genes APC, BRAF, PTGS2, DUSP10, YAP1 y el resto de genes estudiados. (D) Representación gráfica de algunos genes analizados con alta correlación en co-expresión (correlación de Pearson y Spearman). Los colores de los puntos corresponden a: sin alteración en ambos genes (azul), ambos genes alterados (rojo) o alteraciones en uno de ellos (amarillo/rosa).

4.2. La proteína YAP1 está regulada por la ruta de COX2 a través de PGF_{2α}.

Los resultados expuestos previamente relacionaron la expresión de DUSP10 con YAP1. Nos planteamos si existía una relación inductor/efector entre Ca²⁺/COX2/PG y YAP1, como la ya existente con DUSP10. Observamos que los niveles de expresión por ARNm de YAP1 aumentaron significativamente 13.6 veces con IO y 1.5 veces con PGF_{2α}. Por el contrario, los tratamientos con FSK y PGE₂ redujeron ligeramente los niveles de expresión de YAP1 (**Figura R-18A**). Analizando la expresión proteica de YAP1 vimos únicamente un incremento al tratar con PGF_{2α} e IO (**Figura R-18B**). Al mismo tiempo, PGF_{2α} mostró un aumento de la expresión de YAP1 principalmente en el núcleo, mientras que PGE₂ significativamente redujo el nivel de proteína global y nuclear de las células (**Figura R-18C**). Sin embargo, el antagonista específico del receptor FP (AL) y el inhibidor de la calcineurina (CsA) bloquearon la inducción de YAP1 por PGF_{2α} en la línea HT29-lucD6 (**Figura R-18D**).

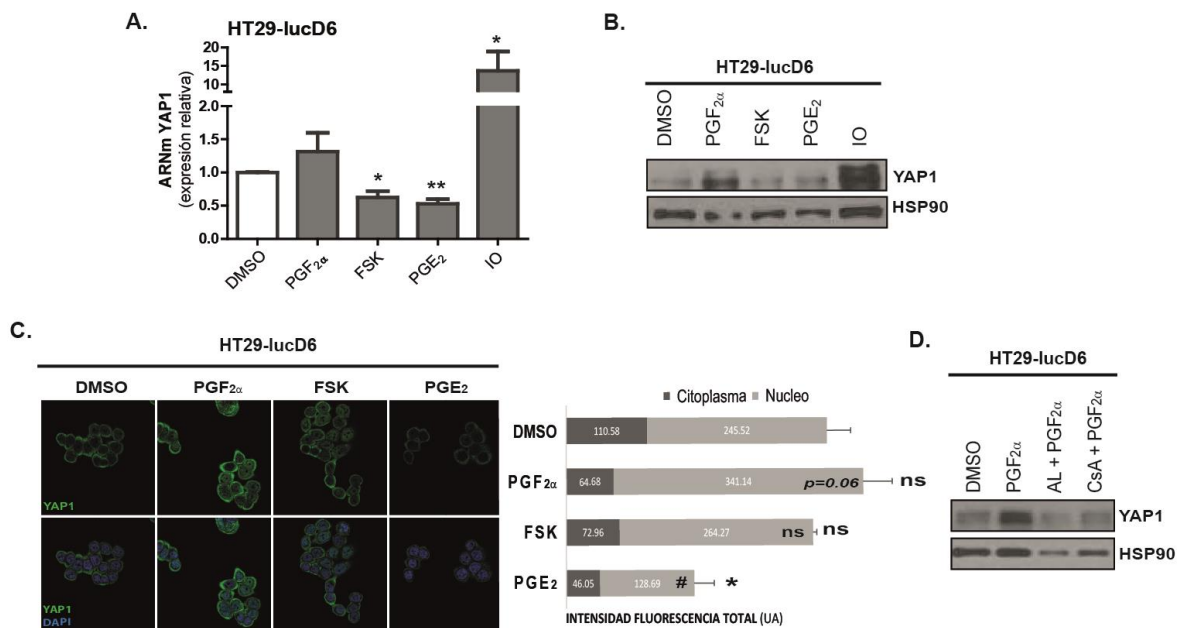


Figura R-18. Inducción de YAP1 por PGF_{2α}/Ca²⁺. (A) Análisis de los niveles de ARNm de YAP1 por RT-qPCR tras el tratamiento con PGF_{2α} (1 μM), FSK (1 μM), PGE₂ (1 μM) e IO (1 μM) durante 24 h. Se normalizó con respecto al tratamiento control (DMSO), representándose la media ± SEM de 3 experimentos independientes (*p<0.05; **p<0.01). (B) Detección de los niveles de la proteína YAP1 tras los mismos tratamientos y tiempo del apartado anterior por WB. (C) Inmunodetección de YAP1 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) tras tratar las células con PGF_{2α} (1 μM), FSK (1 μM) y PGE₂ (1 μM) durante 24 h. Bajo las imágenes representativas de IF, se muestra la media ± SEM de la intensidad de fluorescencia y se normaliza con respecto al tratamiento con DMSO para la cuantificación de proteína total (*p<0.05; ns=no significativo) y para la cuantificación de proteína nuclear (#p<0.05; ns=no significativo). (D) Detección de los niveles de proteína YAP1 por WB en las células HT29-lucD6 tras pre-tratar durante 1 h con el inhibidor AL8816 (AL, 50 μM) o la ciclosporina A (CsA, 100 ng/ml) antes de añadir PGF_{2α} (1 μM) durante 3 h. En todos los casos, los geles son representativos de 3 experimentos independientes.

4.3. DUSP10 promueve el desarrollo de xenoinjertos tumorales *in vivo*.

Los resultados previos obtenidos dieron pie a estudiar el papel de DUSP10 en el desarrollo de tumores. En primer lugar, utilizamos las líneas de CCR en un modelo de xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos para estudiar el desarrollo tumoral *in vivo* (Eccles et al., 1994). Las células HT29-lucD6 control (HT29-EV) o sobreexpresando DUSP10 (HT29-DUSP10) fueron inyectadas subcutáneamente en el flanco posterior del ratón. Durante 8 semanas se midió la progresión de los tumores por BLI y volumen tumoral, finalizando el experimento con la extracción y análisis por IHQ y RT-qPCR (**Figura R-19A**). A partir de la tercera semana, los tumores DUSP10 tuvieron un mayor volumen que los tumores EV (**Figura R-19B**). La BLI permitió cuantificar desde la primera semana, obteniéndose también una mayor señal en los tumores HT29-DUSP10 que en los tumores HT29-EV (**Figura R-19C**). A tiempo final de experimentación, los xenoinjertos HT29-DUSP10 mostraron niveles de ARNm de *DUSP10* 11.5 veces mayores que en los xenoinjertos HT29-EV. Sin embargo, no se detectaron diferencias ni en la inducción de *YAP1* ni en su gen diana *CTGF*, pero sí se encontró un aumento de 5.7 veces la expresión ($p=0.063$) del gen *CYR61* en los tumores HT29-DUSP10 (**Figura R-19D**). El análisis histológico mostró que los tumores generados a partir de las células HT29-DUSP10 tuvieron una mayor expresión de DUSP10 y una menor expresión de p-p38 en comparación con los tumores HT29-EV. En paralelo, vimos una cantidad alta de núcleos celulares positivos para ki67 y una alta expresión de YAP1, independiente de la línea HT29-lucD6 originaria del tumor (**Figura R-19E**).

El experimento inverso, utilizando la línea HT29-lucD6 con dos silenciamientos para DUSP10 (HT29-shDUSP10), nos permitió estudiar cómo influye la disminución de la expresión de DUSP10 en el desarrollo tumoral (**Figura R-20A**). Desde la cuarta semana, los tumores HT29-shDUSP10 tuvieron menor tamaño que los tumores HT29-SCR (**Figura R-20B**). La BLI mostró como las curvas de crecimiento fueron significativamente menores en los tumores HT29-shDUSP10 desde la tercera semana (**Figura R-20C**). Únicamente, observamos una disminución significativa de los niveles de ARNm de *CYR61* en los tumores HT29-shDUSP10 (B) (**Figura R-20D**). La IHQ reveló una expresión muy baja, casi no detectable, de DUSP10 en todos los tumores generados a partir de las diferentes líneas HT29-shDUSP10. Sin embargo, sí detectamos mayor expresión de p-p38 en todos los tumores HT29-shDUSP10, y encontramos menor cantidad de núcleos positivos para ki67 en los tumores HT29-shDUSP10 (B). Al igual que ocurría en los xenoinjertos HT29-DUSP10, el nivel de expresión de YAP1 fue alto en todos los tumores generados, independientemente de la línea celular HT29-lucD6 xenoinjertada (**Figura R-20E**).

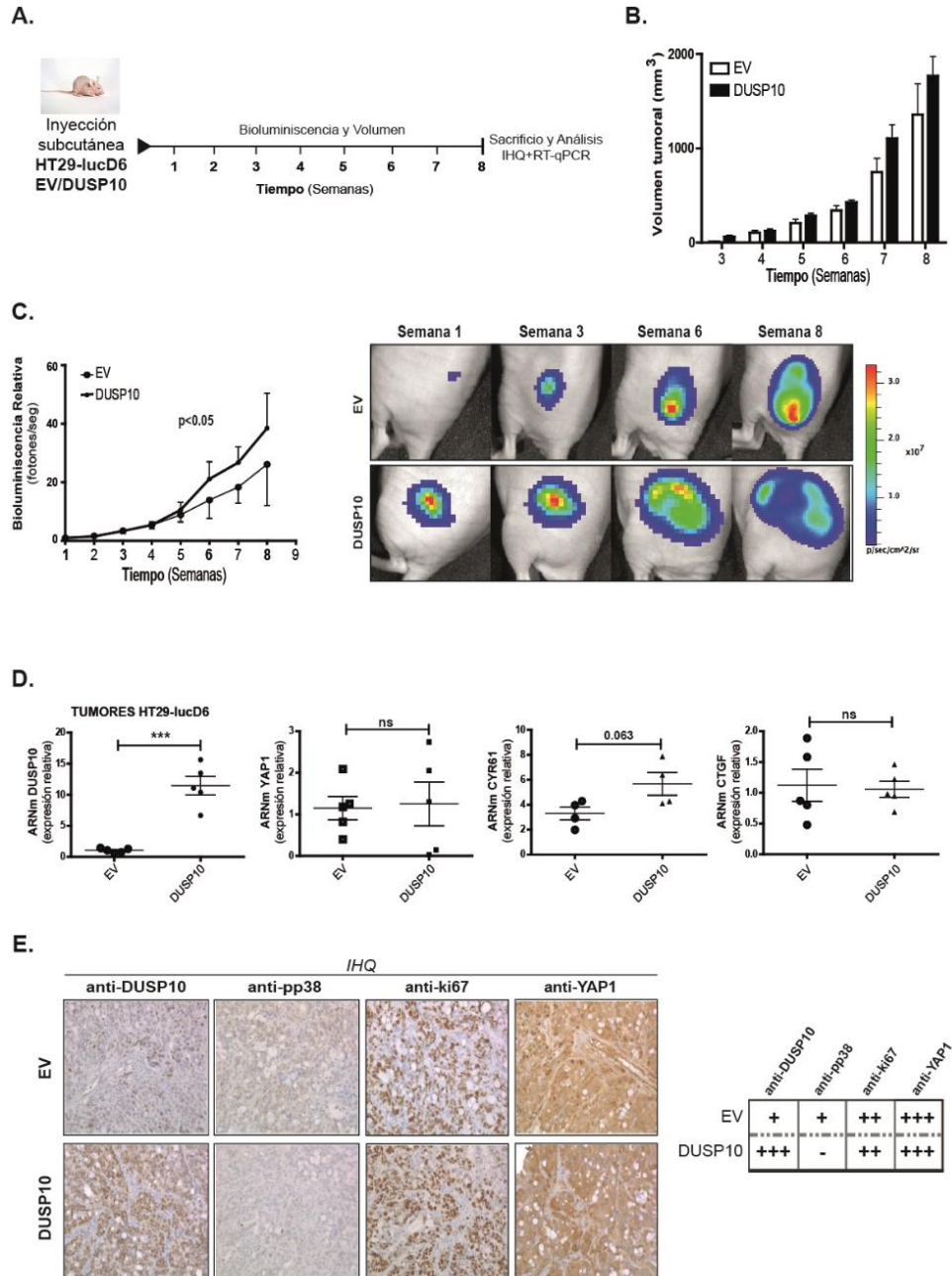


Figura R-19. La sobreexpresión de DUSP10 en HT29-lucD6 favorece el crecimiento tumoral de los xenoinjertos. (A) Esquema del procedimiento experimental seguido para el crecimiento de xenoinjertos en ratones inmunodeficientes en la inoculación de células HT29-lucD6 control (HT29-lucD6-EV) y con DUSP10 sobreexpresado (HT29-lucD6-DUSP10). (B) Medición del volumen tumoral mediante calibre en los tumores generados a partir de las líneas HT29-lucD6-EV (EV) y HT29-lucD6-DUSP10 (DUSP10). (C) Cuantificación de BLI de los tumores generados por las células HT29-lucD6. Se normalizan las medidas con respecto a cada ratón a primer día de medición y se representa la media \pm SEM. Las imágenes mostradas son representativas de la BLI detectada en cada grupo a diferentes tiempos experimentales. (D) Análisis de los niveles de expresión de los genes DUSP10, YAP1, CYR61 y CTGF por RT-qPCR en los tumores generados. Se utiliza el gen GAPDH como gen de referencia. Se representó la media \pm SEM y se comparó con respecto a los tumores control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo). (E) Imágenes representativas de la expresión de las proteínas DUSP10, p-38, ki67 y YAP1 detectadas mediante IHQ en los tejidos tumorales de los xenoinjertos EV y DUSP10. El cuadro asociado a las imágenes representa por cruces (incremento de expresión) y guiones (sin expresión) los niveles medios detectados de cada proteína en todas las imágenes analizadas.

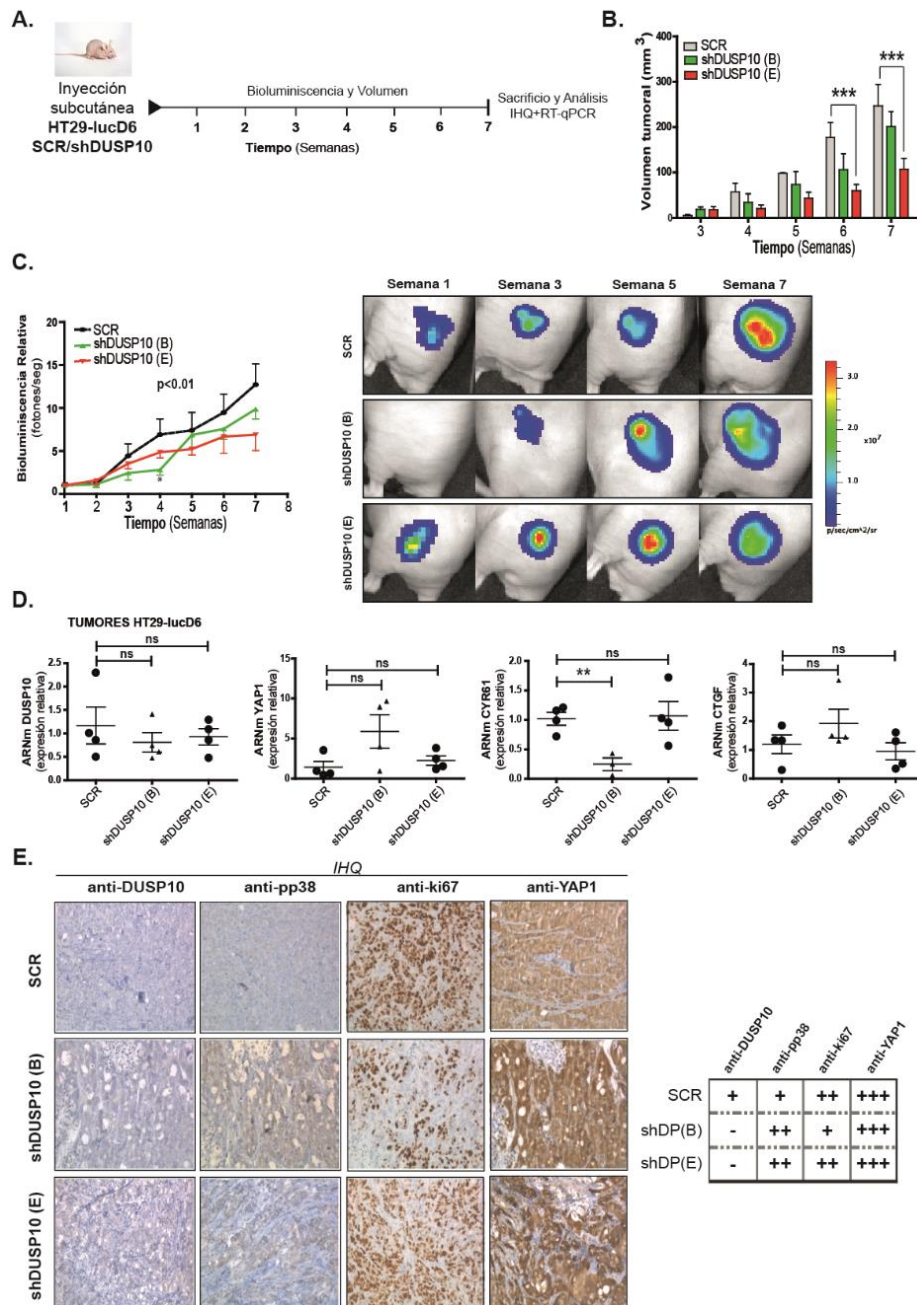


Figura R-20. El silenciamiento de DUSP10 en HT29-lucD6 ralentiza el desarrollo tumoral de los xenoinjertos. (A) Esquema del procedimiento experimental seguido para el crecimiento de xenoinjertos en ratones inmunodeficientes tras la inoculación de células HT29-lucD6 control de silenciamiento (HT29-SCR) y silenciando DUSP10 (HT29-shDUSP10). **(B)** Medición del volumen tumoral mediante calibre manual en los tumores generados a partir de las líneas HT29-lucD6-SCR (SCR) y HT29-lucD6-shDUSP10 (shDUSP10). **(C)** Cuantificación de BLI de los tumores generados por las células HT29-lucD6. Se normalizan las medidas con respecto a cada ratón a primer día de medición, se representa la media \pm SEM. Las imágenes mostradas son representativas de la BLI detectada en cada grupo a diferentes tiempos experimentales. **(D)** Análisis de los niveles de expresión de los genes DUSP10, YAP1, CYR61 y CTGF por RT-qPCR en los tumores generados. Se utiliza el gen GAPDH como gen de referencia. Se representa la media \pm SEM y se compara con respecto a los tumores control (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns=no significativo). **(E)** Imágenes representativas de la expresión de las proteínas DUSP10, p-p38, ki67 y YAP1 detectadas mediante IHQ en los tejidos tumorales de los xenoinjertos SCR y shDUSP10. El cuadro asociado a las imágenes representa por cruces (incremento de expresión) y guiones (sin expresión) los niveles detectados de cada proteína en las muestras tumorales.

Para confirmar los resultados anteriores, utilizamos la línea HCT116 sobreexpresando DUSP10 para estudiar el crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos. Antes de iniciar los experimentos *in vivo*, comprobamos que la línea HCT116 con sobreexpresión estable de DUSP10 (HCT116-DUSP10) tuvo niveles de expresión de dicho gen significativamente mayores que la línea HCT116 control (HCT116-EV) (**Figura R-21A**). Los ensayos de proliferación a tiempo real también mostraron que la línea HCT116-DUSP10 creció significativamente más que la línea HCT116-EV, como ya habíamos demostrado con HT29 (**Figura R-21B**). Los xenoinjertos formados por la línea HCT116-DUSP10 tuvieron siempre mayor volumen tumoral que los tumores HCT116-EV (**Figura R-21C**). La expresión de *DUSP10* y *YAP1* no mostró diferencias entre las líneas celulares al final del experimento. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *CTGF* y *CYR61*, aumentando 3.4 veces el primero y disminuyendo un 50% la expresión del segundo (**Figura R-21D**). La inmunodetección de DUSP10 en los xenoinjertos mostró una mayor expresión de dicha proteína en los tumores HCT116-DUSP10 en comparación a HCT116-EV. Al mismo tiempo, no se detectó p-p38, vimos la misma cantidad de núcleos positivos para ki67 y la misma expresión de YAP1 en todas las muestras analizadas, independientemente del origen de línea HCT116 xenoinjertada (**Figura R-21E**).

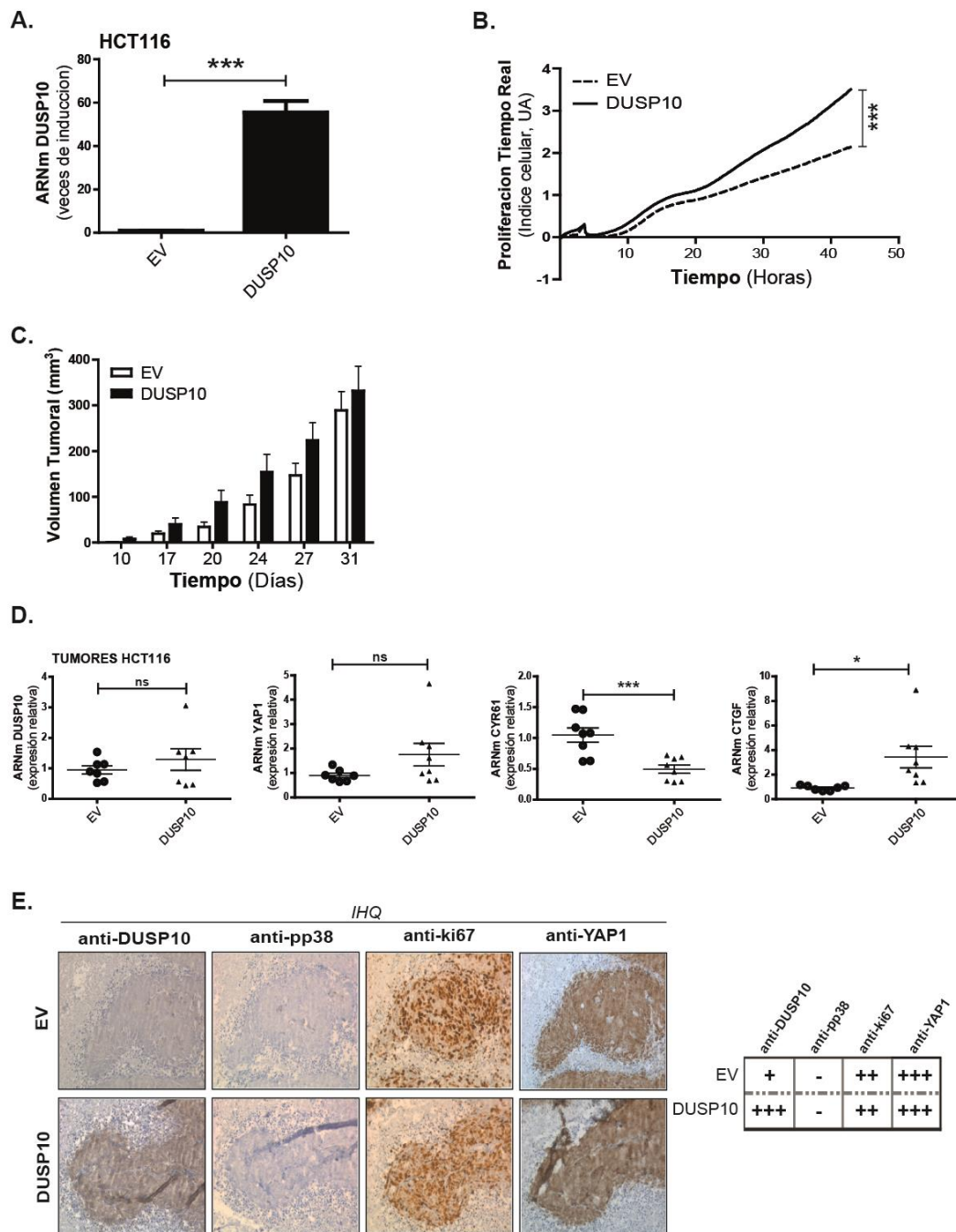


Figura R-21. La sobreexpresión de DUSP10 en HCT116 promovió un mayor crecimiento tumoral de los xenoinjertos. (A) Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de DUSP10 en la línea HCT116 con sobreexpresión estable de DUSP10 (HCT116-DUSP10). Se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes y se normaliza a la línea control (HCT116-EV) (** $p < 0.001$). **(B)** Análisis de la proliferación a tiempo real del crecimiento de las líneas HCT116-EV y HCT116-DUSP10 durante 42 h mediante el sistema xCELLigence (** $p < 0.001$). **(C)** Medición del volumen tumoral mediante calibre en los tumores generados a partir de las líneas HCT116-EV (EV) y HCT116-DUSP10 (DUSP10). **(D)** Análisis de los niveles de expresión de los genes DUSP10, YAP1, CYR61 y CTGF por RT-qPCR en los tumores generados. Se representa la media \pm SEM y se compara con respecto a tumores control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; ns=no significativo). **(E)** Imágenes representativas de la expresión de las proteínas DUSP10, p-p38, ki67 y YAP1 detectadas mediante IHQ en los tejidos tumorales de los xenoinjertos EV y DUSP10. El cuadro asociado a las imágenes representa por cruces (incremento de expresión) y guiones (sin expresión) los niveles detectados de cada proteína en las muestras tumorales.

4.4. La expresión de COX2, DUSP10, YAP1 y p38 fosforilado correlacionan en CCR.

Habiendo visto la implicación de DUSP10 en el desarrollo de tumores *in vivo* utilizando ratones inmunodeficientes y su activación por COX2/PG *in vitro*, además de su acción a través de YAP1 y p38, nos propusimos estudiar la expresión de estas proteínas en pacientes con CCR. Para ello, analizamos muestras de la zona tumoral y el tejido normal adyacente en una cohorte de 77 pacientes con CCR. La matriz de tejido (TMA) se utilizó para detectar la expresión de las proteínas de interés en todas las muestras simultáneamente por IHQ y se categorizó el nivel de expresión de las proteínas COX2, DUSP10, YAP1 encontrado en débil (nula y débil) o fuerte (moderada y fuerte), mientras que la inmunodetección de p-p38 se clasificó como detección negativa o positiva, en función de su presencia o ausencia en alguna zona de la muestra (**Figura R-22A**). Este método permitió detectar diferencias en localización y expresión de las proteínas tanto en el tejido epitelial tumoral como el tejido epitelial normal (**Figura R-22B**). El análisis del tejido tumoral mostró diferencias significativas en la co-expresión de COX2 y DUSP10 citoplásmicos, y entre YAP1 y DUSP10 nuclear. Globalmente, el 59.7% de los pacientes analizados presentaron una fuerte expresión tanto para DUSP10 como COX2 citoplásmico, mientras que sólo el 11.9% mostró una expresión débil para ambas proteínas. El 63.5% de los pacientes presentaron fuerte expresión de YAP1 y DUSP10 nuclear. Una gran mayoría de los pacientes fueron p-p38 negativo, correlacionando con una fuerte expresión de DUSP10 en el citoplasma (81.3%) y el núcleo (76.6%), de acuerdo con la supuesta actividad fosfatasa de DUSP10 (**Tabla R-1A**). Este mismo análisis con las muestras de tejido epitelial normal no mostró diferencias entre la expresión de COX2 y DUSP10 en el citoplasma. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas en la relación de expresión entre DUSP10 y YAP1 nuclear, revelando que el 86.4% de los pacientes tuvieron una expresión fuerte en ambas proteínas y el 3.4% una expresión débil. En el epitelio normal, la fuerte expresión de DUSP10 en citoplasma y/o núcleo no correlacionó con la detección de p-p38 tan claramente como en el tejido epitelial tumoral (**Tabla R-1B**).

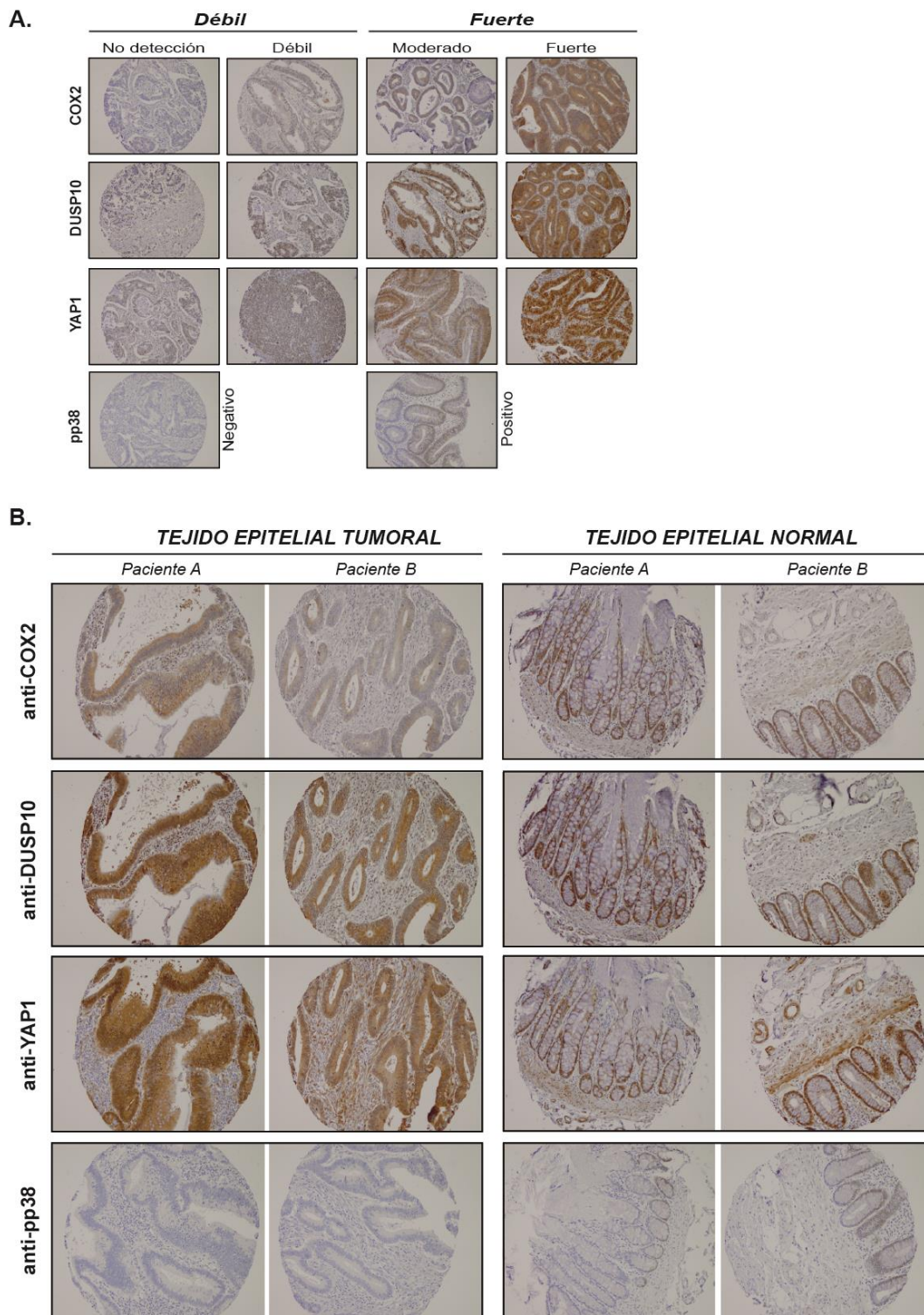


Figura R-22. Detección por IHQ de la expresión de COX2, DUSP10, YAP1 y p-p38 en muestras de tejido epitelial tumoral y normal de pacientes con CCR. (A) Escala asignada al diferente nivel de expresión de COX2, DUSP10, YAP1 detectados en las muestras. La expresión de p-p38 se asignó una clasificación binaria de no detección (negativo) y detección (positivo) al no encontrar diferentes niveles de fosforilación. (B) Imágenes representativas de la detección de COX2, DUSP10, YAP1 y p-p38 en el tejido epitelial de dos pacientes.

A.

Análisis de tejido epitelial tumoral de pacientes con cáncer de colon de acuerdo con la expresión de DUSP10, COX2, YAP1 y pp38.

Características	Nº de Pacientes ^a	DUSP10 citoplásmico (n= 67)			DUSP10 nuclear (n= 67)		
		Débil	Fuerte	<i>p-valor</i> ^b	Débil	Fuerte	<i>p-valor</i> ^b
COX2 citoplásmico, Nº (%)							
Débil	22 (32.8)	8 (61.5)	14 (25.9)	0.022	-	-	-
Fuerte	45 (67.2)	5 (38.5)	40 (74.1)		-	-	-
YAP1 nuclear, Nº (%)							
Débil	18 (28.6)	-	-	-	8 (61.5)	10 (20.0)	0.006
Fuerte	45 (71.4)	-	-	-	5 (38.5)	40 (80.0)	
pp38 detección, Nº (%)							
Positivo	2 (3.1)	0 (0.0)	2 (3.7)	1.0	0 (0.0)	2 (3.9)	1.0
Negativo	62 (96.9)	10 (100.0)	52 (96.3)		13 (100.0)	49 (96.1)	

B.

Análisis de tejido epitelial normal de pacientes con cáncer de colon de acuerdo con la expresión de DUSP10, COX2, YAP1 y pp38.

Características	Nº de Pacientes ^a	DUSP10 citoplásmico (n= 60)			DUSP10 nuclear (n= 60)		
		Débil	Fuerte	<i>p</i> -valor ^b	Débil	Fuerte	<i>p</i> -valor ^b
COX2 citoplásmico, Nº (%)							
Débil	5 (8.3)	1 (50.0)	4 (6.9)	0.161	-	-	-
Fuerte	55 (91.7)	1 (50.0)	54 (93.1)		-	-	-
YAP1 nuclear, Nº (%)							
Débil	8 (13.6)	-	-	-	2 (100.0)	6 (10.5)	0.016
Fuerte	51 (86.4)	-	-	-	0 (100.0)	51 (89.5)	
pp38 detección, Nº (%)							
Positivo	25 (43.1)	2 (100.0)	23 (41.1)	0.181	0 (0.0)	25 (44.6)	0.501
Negativo	33 (56.9)	0 (0.0)	33 (58.9)		2 (100.0)	31 (55.4)	

Tabla R-1. Análisis del tejido epitelial de pacientes con CCR de acuerdo con la expresión de COX2, DUSP10, YAP1 y p-p38.

(A) En el tejido epitelial tumoral se asocia la expresión débil y fuerte de COX2 en el citoplasma, DUSP10 en el citoplasma y núcleo, YAP1 en núcleo y la detección positiva o negativa de p-p38 en el total de muestras. ^a De los 73 pacientes en la cohorte estudiada, 6, 10, 9 y 6 muestras no pudieron ser evaluadas para COX2, YAP1, p-p38 y DUSP10, respectivamente. (B) En el tejido epitelial normal se asocia la expresión débil y fuerte de COX2 en el citoplasma, DUSP10 en el citoplasma y núcleo, YAP1 en núcleo, y la detección positiva o negativa de p-p38 en el total de muestras. ^a De los 73 pacientes en la cohorte estudiada, 13, 14, 15 y 13 muestras no pudieron ser evaluadas para COX2, YAP1, p-p38 y DUSP10, respectivamente. ^b Se analizaron estadísticamente las muestras mediante ANOVA y se resaltaron en negrita los p-valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

4.5. La presencia de DUSP10 nuclear correlaciona con la supervivencia en pacientes con CCR.

Para realizar un estudio de supervivencia válido dependiente de la expresión de DUSP10, se utilizó otra cohorte con un mayor número de pacientes (999) diagnosticados de CCR a los cuales se les hizo un seguimiento durante seis años. La expresión de DUSP10 citoplásmico y nuclear se analizó en el total de muestras de los pacientes, siguiendo la misma categorización que en el apartado anterior y correlacionado la expresión en cada muestra con las características clínico-patológicas del paciente. Observamos que la expresión de DUSP10 en el citoplasma de las células tumorales correlacionó significativamente con una distribución diferencial de los pacientes en dos variables clínico-patológicas: grado de diferenciación del epitelio de colon y tratamiento con quimioterapia. Ambas variables no fueron consideradas de gran peso en nuestro estudio, debido a que el grado de diferenciación se considera una categorización histopatológica muy específica de la zona de transformación analizada en el paciente, del mismo modo que el tratamiento con quimioterapia fue combinado y variable durante el seguimiento de los pacientes. Sin embargo, la expresión de DUSP10 nuclear aportó interesantes diferencias significativas en el análisis del estadio tumoral de la enfermedad (**Tabla R-2**). Tras un ajuste estadístico más preciso teniendo en cuenta los parámetros de edad, género y quimioterapia, como confundidores, vimos que la alta expresión de DUSP10 nuclear se asoció significativamente ($p=0.03$) con un estadio tumoral más avanzado y una razón de probabilidades (OR, *odds ratio*) de 1.319 (95% IC, 1.032-1.684) en comparación con la baja expresión de DUSP10 nuclear (**DNM**). La supervivencia dependiente de la expresión de DUSP10 tras un análisis estadístico univariante mostró como pacientes con alta expresión de DUSP10 nuclear sobrevivieron menos ($p=0.046$) y tuvieron un riesgo (RR, *Relative Hazard Ratio*) de 1.22 (95% IC, 1.00-1.49) más elevado a fallecer que los pacientes con baja expresión de dicha proteína. Cuando se tuvieron en cuenta factores como género, edad y quimioterapia, la supervivencia en pacientes con alta expresión de DUSP10 nuclear seguía siendo significativamente menor ($p=0.033$) con un riesgo de 1.24 (95% IC, 1.02-1.51) en comparación con la baja expresión, y no variando mucho con los resultados obtenidos en el análisis univariante. Finalmente, el análisis multivariante en el que se tuvieron en cuenta el género, edad, quimioterapia y, además, el estadio tumoral de los pacientes mostró como la menor supervivencia asociada a la alta expresión de DUSP10 dejó de ser significativa ($p=0.189$) y el riesgo disminuyó a 1.14 (95% IC, 0.94-1.4) en comparación con la supervivencia en pacientes con baja expresión de DUSP10 en el núcleo (**Tabla R-3 y Figura R-23**), confirmando de esta manera la asociación de DUSP10 con el estadio tumoral.

Análisis de la expresión de DUSP10 del tejido tumoral de pacientes con cáncer de colon.							
Características	Nº de Pacientes	DUSP10 citoplásmico (n= 961)			DUSP10 nuclear (n= 961)		
		Débil	Fuerte	p-valor ^b	Débil	Fuerte	p-valor ^b
Sexo, Nº (%)							
Mujer	479 (49.8)	293 (51.7)	186 (47.2)	0.190	235 (47.7)	244 (52.1)	0.176
Hombre	482 (50.2)	274 (48.3)	208 (52.8)		258 (52.3)	224 (47.9)	
Edad, Nº (%)							
≤65	329 (34.2)	199 (35.1)	130 (33.0)	0.457	155 (31.4)	174 (37.2)	0.156
66-74	292 (30.4)	172 (30.3)	120 (30.5)		159 (32.3)	133 (28.4)	
≥75	340 (35.4)	196 (34.6)	144 (36.5)		179 (36.3)	161 (34.4)	
Estadio, Nº (%)							
I	136 (14.2)	88 (15.6)	48 (12,2)	0.391	80 (16.2)	56 (12.0)	0.043
II	392 (40.9)	232 (41.1)	160 (40.7)		201 (40.8)	191 (41.1)	
III	271 (28.3)	147 (26.0)	124 (31.6)		140 (28.4)	131 (28.2)	
IV	159 (16.6)	98 (17.3)	61 (16.6)		72 (14.6)	87 (18.7)	
Desconocido	3 (0.3)						
Grado, Nº (%)							
Bien diferenciado	96 (10.0)	50 (8.8)	46 (11.7)	0.027	53 (10.8)	43 (9.2)	0.185
Pobremente diferencia	607 (63.2)	348 (61.4)	259 (65.7)		293 (59.4)	314 (67.1)	
Mal diferenciado	182 (18,9)	118 (20.8)	64 (16.2)		108 (21.9)	74 (15.8)	
Desconocido	76 (7.9)						
Quimioterapia, Nº (%)							
No	673 (70.0)	412 (72,7)	261 (66.2)	0.038	352 (71.4)	321 (68.6)	0.360
Si	288 (30.0)	155 (27.3)	133 (33.8)		141 (28.6)	147 (31.4)	
Radioterapia, Nº (%)							
No	948 (98,6)	557 (98.2)	391 (99.2)	0.259	485 (98.4)	463 (98.9)	0.580
Si	13 (1,4)	10 (1.8)	3 (0.8)		8 (1.6)	5 (1.1)	

Tabla R-2. Características clínico-patológicas en la cohorte de 999 pacientes con CCR relacionados con la expresión de DUSP10. Distribución de los pacientes en función de las características clínicas e histopatológicas y la expresión baja/alta de DUSP10 en el núcleo y en el citoplasma de las células epiteliales tumorales. Análisis estadístico de ANOVA de dos factores para el estudio de las variaciones en la distribución de las muestras de los pacientes, resaltando en negrita las diferencias significativas encontradas ($p < 0.05$). 38 pacientes no pudieron ser analizados para la expresión de DUSP10 y no fueron incluidos en la estadística.

Rate Ratio (RR) para la expresión de DUSP10 nuclear acorde con el número de muertes ocurridas en pacientes con cáncer de colon.								
DUSP10 nuclear	Nº de Pacientes	No. de Muertes	RR Univariante (95% IC)	p-valor ^b	RR Ajustado ¹ (95% IC)	p-valor ^b	RR Ajustado ² (95% IC)	p-valor ^b
Débil	481	211	1 [Referencia]	0.06	1 [Referencia]	0.04	1 [Referencia]	0.18
Fuerte	459	213	1.20 (0.99-1.46)		1.22 (1.01-1.48)		1.14 (0.94-1.39)	

Tabla R-3. Análisis de supervivencia en pacientes con CCR dependiendo de los niveles de expresión de DUSP10. Los pacientes se clasificaron en baja y alta expresión de DUSP10 analizando el número de eventos (fallecimientos) dentro de cada grupo. (RR) Análisis univariante teniendo en cuenta únicamente la expresión de DUSP10. (RR1) Análisis multivariante teniendo en cuenta los factores género, sexo y tratamiento con quimioterapia. (RR2) Análisis multivariante que, además de los confundidores analizados en RR1, incluye el estadio tumoral de la enfermedad. En todos los análisis se obtuvieron los índices de riesgo relativos (RR, Relative Hazard Ratio) con un intervalo de confianza (IC) del 95% y se toma como referencia la expresión baja de DUSP10 para la obtención de la significancia ($p < 0.05$).

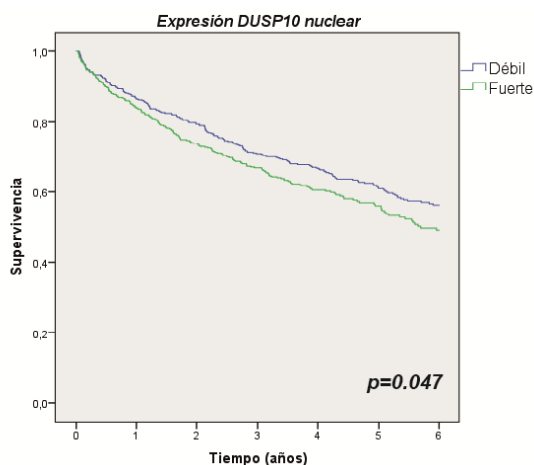


Figura R-23. Curva de supervivencia en 999 pacientes en función de la expresión de DUSP10 en el núcleo de las células epiteliales tumorales. Representación de las curvas de supervivencia de pacientes con baja expresión (curva azul) y alta expresión (curva verde) de DUSP10 en el núcleo de las células epiteliales tumorales de colon durante 6 años de seguimiento, teniendo en cuenta los confundidores edad, género, quimioterapia y estadio tumoral.

5. Implicación de DUSP10 en la inflamación intestinal.

La inflamación intestinal es un paso previo al desarrollo del CCR. Un análisis del perfil de expresión génica disponible en *GEO Database* (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*, USA) nos permitió obtener una idea previa de cómo se estarían comportando algunos genes de interés en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales (IBD). Se utilizó el estudio transcriptómico GDS3268 (GSE11223) que cuenta con 202 muestras de biopsias procedentes de 67 pacientes diagnosticados con CU en el que los autores estudian la expresión génica por *array* del tejido normal y afectado, las diferentes partes del colon y las zonas de inflamación (Noble et al., 2008). Centramos nuestro estudio comparativo en el tejido normal y el tejido afectado por CU y obtuvimos una mayor expresión de *DUSP10* (sonda 18939) y *YAP1* (sonda 28694), y una menor expresión ($p<0.1$) de *MAPK14* (sonda 4412), *PTGER4* (sonda 17243), *PTGS2* (sonda 39167) y *PTGS1* (sonda 11856) en los pacientes con CU con respecto a los pacientes control (DNM).

5.1. La expresión de DUSP10 está alterada en pacientes con IBD.

Estos resultados obtenidos *in silico* dieron pie a estudiar la expresión de DUSP10 y COX en muestras de pacientes con IBD. Para ello, analizamos 21 muestras de colon y recto provenientes de 14 pacientes diagnosticados para CU o EC o considerados negativos para ambas enfermedades, siendo estos últimos asignados como controles sanos (CS). En este estudio se incluyó a COX1 como una proteína control, debido a que su expresión es considerada constitutiva e indicativa de la integridad de la mucosa gástrica (Kargman et al., 1996). Obtuvimos diferencias en los niveles de expresión de DUSP10, COX2 y COX1 entre las zonas del epitelio gástrico en todos los grupos de pacientes (**Figura R-24**). Por tanto, clasificamos las muestras en función del nivel de expresión (bajo o alto), el grupo de diagnóstico y la zona del epitelio de la cripta. De esta manera, pudimos distinguir entre las células

epiteliales más apicales de la cripta, mayoritariamente enterocitos (células absortivas), el epitelio de la cripta lateral compuesto por células caliciformes y cilíndricas, y las células de la cripta basal que corresponderían mayoritariamente a células progenitoras y enteroendocrinas. Lo primero a resaltar fue que debido al número tan bajo de muestras disponibles para analizar no se pudieron sacar resultados estadísticamente significativos en ningún caso, pero si observamos alguna tendencia. En las células epiteliales de la cripta apical vimos un porcentaje alto de CS expresando bajo nivel de DUSP10 y COX2. En CU se vio mayor número de muestras con alto DUSP10 y COX1, y bajo COX2. Las muestras de EC se distribuyeron porcentualmente en una mayor detección de COX2 y menor de DUSP10 y COX1 (**Tabla R-4A**). El análisis de las células de la cripta lateral mostró que todos los grupos de diagnóstico tendieron a agruparse con un mayor número de muestras en baja expresión de DUSP10, COX2 y COX1 (**Tabla R-4B**). Finalmente, el análisis en las células de la cripta basal mostró un patrón de expresión muy parecido al detectado en las células de la cripta lateral, predominando las muestras con baja expresión de DUSP10, COX2 y COX1 en todos los grupos de diagnóstico (**Tabla R-4C**).

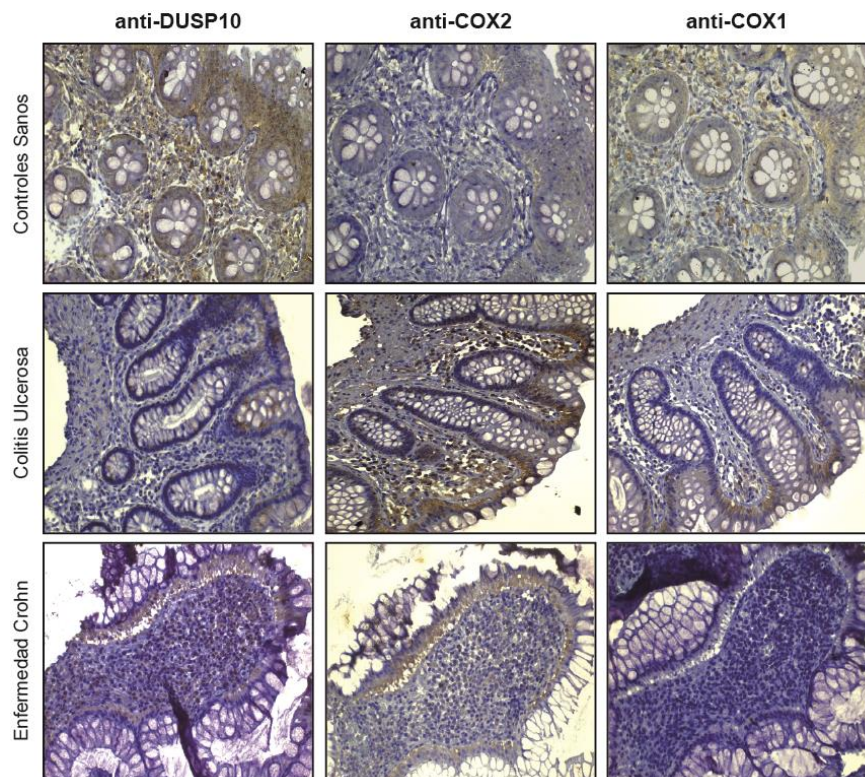


Figura R-24. Detección de las proteínas DUSP10, COX2 y COX1 en pacientes con IBD. Análisis de la expresión de DUSP10, COX2 y COX1 por IHQ en 21 muestras de tejido de colon o recto de pacientes no diagnosticados (controles sanos, CS) o pacientes diagnosticados para colitis ulcerosa (CU) o enfermedad de Crohn (EC).

A.

DIAGNOSTICO, Nº (%)	CRIPTA APICAL								
	DUSP10 (n=21)			COX2 (n=20)			COX1 (n=20)		
	Bajo	Alto	p-valor	Bajo	Alto	p-valor	Bajo	Alto	p-valor
Control Sano	4 (36.4)	2 (20.0)	0.300	4 (30.8)	1 (14.3)	0.493	3 (23.1)	2 (28.6)	0.188
Colitis Ulcerosa	2 (18.2)	5 (50.0)		5 (38.5)	2 (28.6)		3 (23.1)	4 (57.1)	
Enfermedad Crohn	5 (45.5)	3 (30.0)		4 (30.8)	4 (57.1)		7 (53.8)	1 (14.3)	

B.

DIAGNOSTICO, Nº (%)	CRIPTA LATERAL								
	DUSP10 (n=21)			COX2 (n=20)			COX1 (n=20)		
	Bajo	Alto	p-valor	Bajo	Alto	p-valor	Bajo	Alto	p-valor
Control Sano	3 (17.6)	3 (75.0)	0.061	4 (25.0)	1 (25.0)	0.875	4 (21.1)	1 (100.0)	0.206
Colitis Ulcerosa	7 (41.2)	0 (0.0)		6 (37.5)	1 (25.0)		7 (36.8)	0 (0.0)	
Enfermedad Crohn	7 (41.2)	1 (25.0)		6 (37.5)	2 (50.0)		8 (42.1)	0 (0.0)	

C.

DIAGNOSTICO, Nº (%)	CRIPTA BASAL								
	DUSP10 (n=21)			COX2 (n=20)			COX1 (n=20)		
	Bajo	Alto	p-valor	Bajo	Alto	p-valor	Bajo	Alto	p-valor
Control Sano	4 (22.2)	2 (66.7)	0.227	4 (23.5)	1 (33.3)	0.375	4 (21.1)	1 (100.0)	0.206
Colitis Ulcerosa	7 (38.9)	0 (0.0)		7 (41.2)	0 (0.0)		7 (36.8)	0 (0.0)	
Enfermedad Crohn	7 (38.9)	1 (33.3)		6 (35.3)	2 (66.7)		8 (42.1)	0 (0.0)	

Tabla R-4. Análisis de la distribución de las muestras entre los diferentes grupos de pacientes de IBD en función del nivel de expresión de DUSP10, COX2 y COX1. Clasificación de la expresión de dichas proteínas analizadas en 21 muestras procedentes de 14 pacientes en las células epiteliales de (A) la cripta apical, (B) la cripta lateral y (C) la cripta basal. Se calcularon las diferencias entre grupos de diagnósticos para cada proteína mediante un estudio de Chi-cuadrado, considerándose la diferencia significativa a p-valor<0.05.

5.2. Expresión de DUSP10 y YAP1 en CAC en ratones.

Con la finalidad de poder estudiar el cáncer asociado a colitis (CAC), mimetizamos el proceso en un modelo de ratón basado en la administración de una dosis del carcinógeno azoximetano (AOM), que promueve la formación de tumores específicamente en el colon, combinado con ciclos de agua con y sin sulfato sódico de dextrano (DSS) que irrita la pared del colon, simulando una colitis crónica que en consecuencia promovería el desarrollo de cáncer de colon (Okayasu et al., 1996) (**Figura R-25A**). Analizamos la expresión de DUSP10, YAP1 y CD45. Este último fue utilizado como marcador de infiltración linfocitaria y, por tanto, de inflamación. Los ratones sometidos únicamente a ciclos de DSS y recuperación mostraron un tejido epitelial de colon no alterado con una baja o nula expresión de DUSP10 y YAP1 en las células de las criptas colónicas. Sin embargo, se pudo detectar una alta expresión de CD45, indicando una inflamación e infiltrado linfocitario elevado producido por el tratamiento con DSS (**Figura R-25B**). Los animales sometidos al tratamiento combinado con AOM/DSS formaron tumores a lo largo del colon, también asociados a una mayor infiltración linfocitaria que con

el sólo tratamiento con DSS. Detectamos niveles altos de expresión de DUSP10 y YAP1 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células epiteliales tumorales. Al mismo tiempo, vimos una expresión de DUSP10 y YAP1 alta en el epitelio no tumoral de estos ratones en comparación a los valores obtenidos del epitelio tras tratamiento único con DSS, aunque fue mucho menor que en el tejido tumoral (**Figura R-25C**).

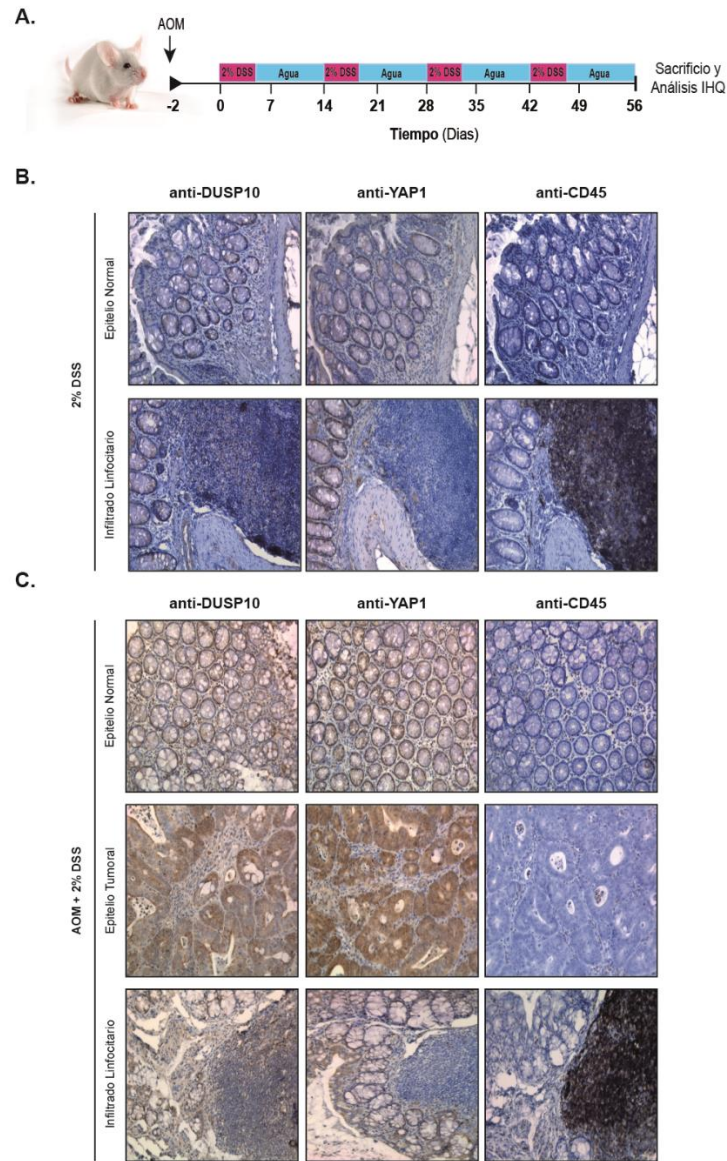


Figura R-25. Detección de DUSP10 y YAP1 en el modelo de CAC en ratones BALBc. (A) Modelo seguido para el establecimiento de CAC. Se muestran los tiempos de la inyección de AOM (10 mg/kg) y los ciclos de administración de 2% DSS, además de días de tratamiento y recuperación. (B) Imágenes representativas del epitelio normal y las zonas con infiltrado linfocitario de ratones tratados únicamente con DSS (grupo control). (C) Imágenes representativas de epitelio no tumoral y tumoral, además de infiltrado de linfocitos, en ratones tratados con AOM/DSS. En todos los casos se detecta DUSP10, YAP1 y CD45 por IHQ en las mismas zonas de tejido.

6. La respuesta a estreses en el ambiente tumoral mediada por DUSP10.

6.1. Contextualización de DUSP10 en cáncer de colon y su resistencia a quimioterapia a través de la biología de sistemas.

Con objeto de contextualizar DUSP10 utilizamos un modelo virtual de cáncer de colon con la empresa *Anaxomics Biotech S.L.* Dicha empresa utilizó todos los datos conocidos hasta el momento sobre la enfermedad analizándolos mediante la tecnología *Therapeutic Performance Mapping* (TPMS). Esta tecnología genera modelos matemáticos capaces de reproducir el comportamiento de la enfermedad e identificar genes, proteínas o metabolitos, cuya actividad es importante en el desarrollo de la patología. Este sistema nos permitió estudiar el nivel de asociación de las proteínas COX2, DUSP10, p38, YAP1 y BRAF con la patofisiología del cáncer de colon y su respuesta a quimioterapéuticos de uso común en la clínica. El sistema generó un grado de asociación (0-100) que se clasificó en alto (100-70, $p < 0.05$), medio (70-40, $p < 0.25$) y bajo (40-0, $p > 0.25$), y se utiliza para valorar el nivel de implicación de las proteínas de manera individual o conjunta en cada caso analizado. Las proteínas COX2, DUSP10, p38, YAP1 y BRAF fueron asociadas con un alto grado (>75) en el cáncer de colon. Concretamente, el modelo postuló que la relación de DUSP10 con el cáncer de colon es a través de p38 y que su participación conjunta con COX2 en la enfermedad tuvo un nivel de asociación alto (79 sobre 100) (**DNM**). Seguidamente, se realizó un análisis más detallado de la asociación en los diferentes procesos biológicos necesarios para el desarrollo del cáncer de colon como la proliferación, la evasión de apoptosis, la angiogénesis, la metástasis o la resistencia a la quimioterapia. Este análisis mostró una asociación alta de COX2 con angiogénesis, DUSP10 con quimioresistencia, y p38 y YAP1 con los procesos de proliferación, metástasis y quimioresistencia. Del mismo modo, BRAF se asoció con proliferación y quimioresistencia (**Tabla R-6A**). Dado que estos resultados mostraron que casi todas las proteínas estudiadas se encontraban altamente relacionadas con la quimioresistencia, analizamos con qué compuestos utilizados actualmente en el tratamiento de la enfermedad podrían nuestras proteínas tener una mayor asociación. Identificamos una asociación significativamente alta entre DUSP10 y el compuesto trametinib (inhibidor de las proteínas MEK), p38 con 5-fluorouracilo (inhibidor de la síntesis de ADN, antimetabolito), oxaliplatino (inhibidor de la síntesis de ADN, intercalador) e irinotecan (inhibidor de la topoisomerasa I), YAP1 con el 5-fluorouracilo y el cetuximab (inhibidor de EGFR,) y, finalmente, BRAF con cetuximab y trametinib (**Tabla R-6B**).

A.

	COX2	DUSP10	P38	YAP1	BRAF
Proliferación	MEDIO	BAJO	ALTO	ALTO	ALTO
Evasión apoptosis	BAJO	MEDIO	MEDIO	BAJO	MEDIO
Angiogenesis	ALTO	BAJO	MEDIO	BAJO	BAJO
Metastasis	BAJO	BAJO	ALTO	ALTO	BAJO
Quimioresistencia	MEDIO	ALTO	ALTO	ALTO	ALTO

B.

	PTGS2	DUSP10	P38	YAP1	BRAF
5-FU	BAJO	BAJO	ALTO	ALTO	BAJO
Oxaliplatin	BAJO	BAJO	ALTO	BAJO	BAJO
Irinotecan	BAJO	MEDIO	ALTO	BAJO	MEDIO
Bevacizumab	BAJO	BAJO	BAJO	BAJO	BAJO
Cetuximab	BAJO	MEDIO	BAJO	ALTO	ALTO
Vemurafenib	BAJO	MEDIO	MEDIO	MEDIO	BAJO
Trametinib	BAJO	ALTO	MEDIO	MEDIO	ALTO

Tabla R-6. Nivel de asociación de las proteínas COX2, DUSP10, p38, YAP1 y BRAF en la patología del cáncer de colon mediante un análisis basado en la biología de sistemas. La empresa Anaxomic utilizó la tecnología basada en la biología de sistemas *Therapeutic Performance Mapping (TPMS)* que estableció un nivel de asociación puntuando de 0 a 100 que clasificamos en *alto* (100-70, $p < 0.05$), *medio* (70-40, $p < 0.25$) y *bajo* (40-0, $p > 0.25$). **(A)** Tabla asociativa entre cada proteína analizada y algunos procesos biológicos implicados en el desarrollo del cáncer de colon. **(B)** Tabla asociativa entre las proteínas de interés con los quimioterapéuticos actuales en el tratamiento del cáncer de colon.

6.2. Resistencia conferida por DUSP10 al estrés genotóxico provocado por los quimioterapéuticos.

Las líneas celulares HT29 generadas fueron utilizadas como modelo *in vitro* para estudiar la respuesta a la genotoxicidad producida por el tratamiento con quimioterapéuticos y su relación con la expresión de COX2 y DUSP10. Con este fin, tratamos las líneas HT29-COX2 y su línea control HT29-CT con CsPt (10 y 25 μM), OxPt (50 y 100 μM) y 5FU (150 μM) durante 24 y 48 h. En las primeras 24 h se redujo significativamente la viabilidad celular en HT29-CT tras algunos tratamientos, observándose una mayor viabilidad en HT29-COX2 en comparación con HT29-CT tras los tratamientos con CsPt (25 μM) y OxPt (50 y 100 μM) (**Figura R-26A**). A las 48 h, todos los tratamientos, excepto el CsPt a 10 μM , redujeron la viabilidad celular más de un 45% en la línea HT29-CT. En contraste, la línea HT29-COX2 fue mucho más resistente a todos los tratamientos (**Figura R-26B**). Estos mismos quimioterapéuticos se utilizaron para estudiar el efecto de la sobreexpresión de DUSP10 sobre la citotoxicidad celular. A las primeras 24 h, sólo con OxPt (100 μM) se produjo un descenso significativo e importante de la viabilidad en la línea HT29-EV, que desaparecía con la sobreexpresión de DUSP10 (**Figura R-26C**). A las 48 h, todos los tratamientos mostraron una reducción significativa de la viabilidad en la línea HT29-EV. La sobreexpresión de DUSP10 provocó una reversión parcial de la disminución de la citotoxicidad provocada en HT29-EV, siempre proporcionalmente menor que al sobreexpresar COX2 (**Figura R-26D**). Cuando estudiamos la línea HT29-shDUSP10 vimos que, a diferencia de lo esperable, no se

detectaron mayores sensibilidades que en HT29-EV, excepto con el tratamiento de OxPt (100 μ M) a 24 h (**Figura R-26E y R-26F**). Finalmente, analizamos la expresión de DUSP10, p38 y p-p38 en las líneas HT29-EV y HT29-DUSP10 tratadas con algunas concentraciones de los quimioterapéuticos utilizados hasta el momento. En HT29-EV, la expresión de DUSP10 disminuyó tras el tratamiento con CsPt y aumentó con los tratamientos de OxPt y 5FU. En HT29-DUSP10, la expresión de DUSP10 sólo disminuyó tras el tratamiento con 5FU a 150 μ M. Sin embargo, la p-p38 sólo se detectó tras el tratamiento con 5FU en HT29-EV, siendo HT29-DUSP10 menos sensible a esta inducción como corresponde a la actividad fosfatasa de DUSP10 (**Figura R-26G**).

Al analizar el ciclo celular observamos que el tratamiento con OxPt disminuyó significativamente el número de células en fase G0/G1, aumentando la fase S y la fase G2/M en la línea control HT29-EV. Con el mismo tratamiento, la sobreexpresión de DUSP10 disminuyó el número de células retenidas en G0/G1 y aumentó significativamente las células en fase S en comparación a HT29-EV. Sin embargo, el tratamiento con 5FU no cambió las fases del ciclo celular en comparación con el tratamiento control con DMSO, excepto una reducción de la fase G2/M en todas las líneas (**Figura R-27A, R-27B y R-27C**).

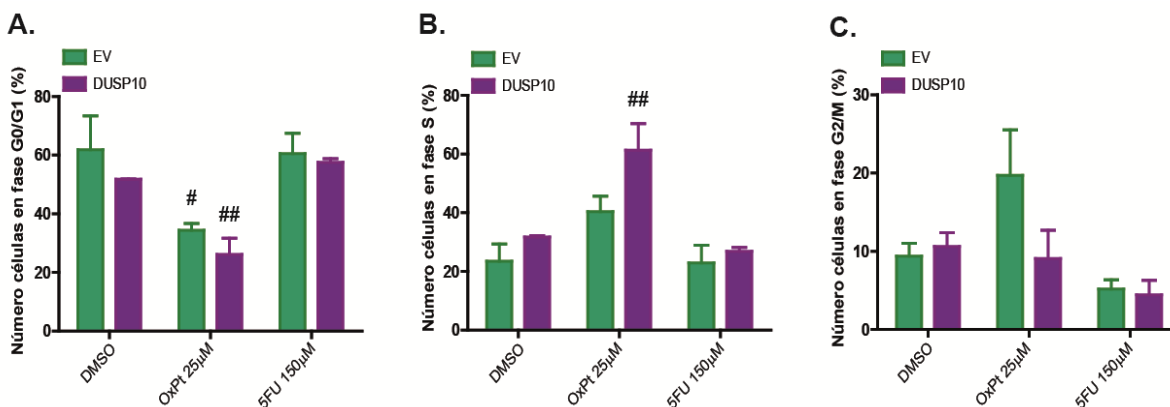


Figura R-27. Alteraciones en el ciclo celular en la línea HT29 sobreexpresando DUSP10 tras el tratamiento con OxPt y 5FU. Análisis de ciclo celular de las líneas HT29-EV y HT29-DUSP10 tras el tratamiento con OxPt (25 μ M) y 5FU (50 μ M) durante 24 h. **(A)** Fase G0/G1, **(B)** fase S y **(C)** fase G2/M. Se representan valores totales y se compara estadísticamente dentro de cada grupo los tratamientos con quimioterapéuticos respecto al tratamiento control con DMSO (*p<0.05; **p<0.01).

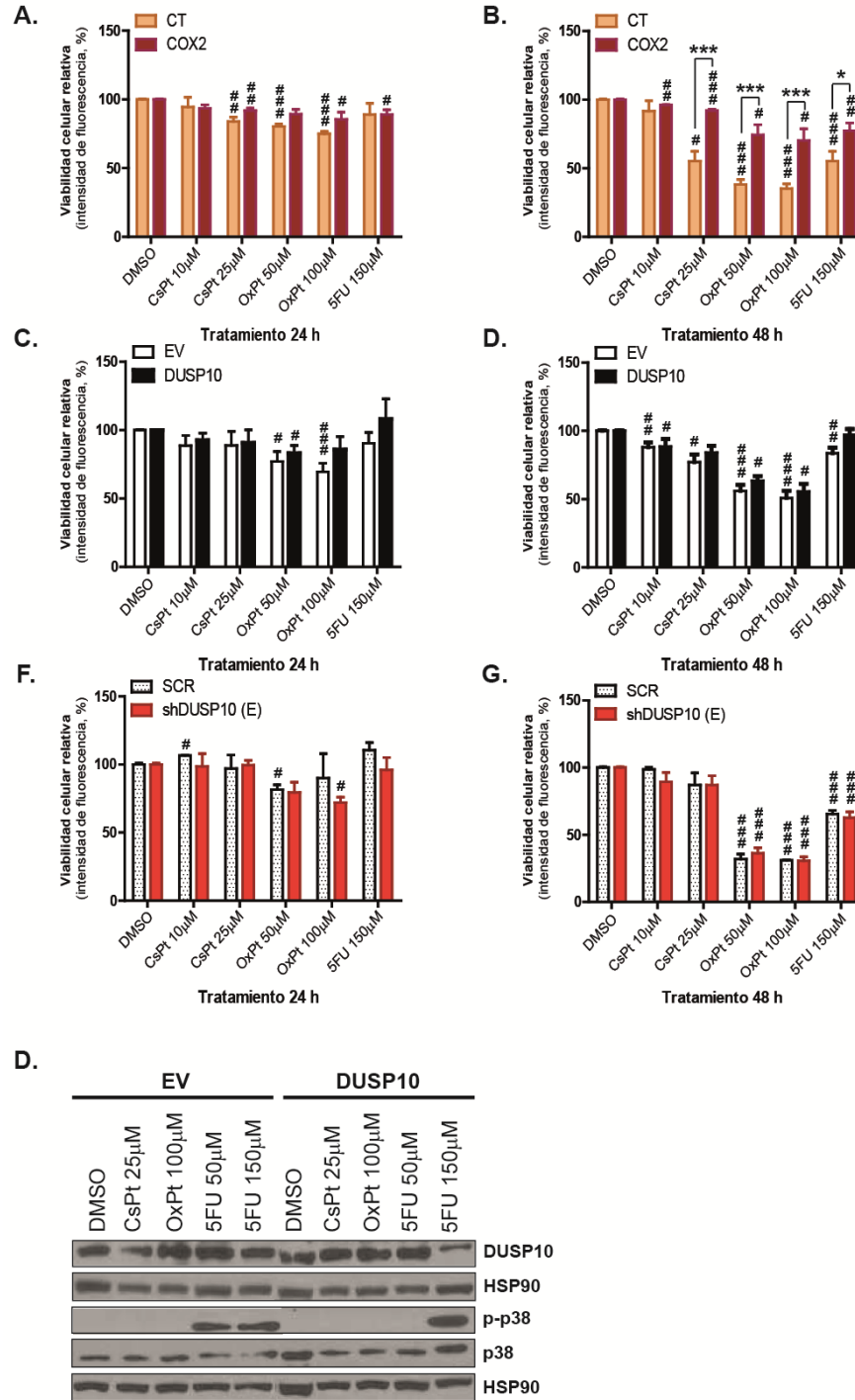


Figura R-26. Viabilidad celular medida en las líneas HT29-COX2/DUSP10/shDUSP10 tras el tratamiento con quimioterapéuticos. (A-B) Las líneas sobreexpresando COX2 (HT29-COX2) y control (HT29-CT), (C-D) sobreexpresando DUSP10 (HT29-DUSP10) y control (HT29-EV) y (E-F) silenciando DUSP10 (HT29-shDUSP10) y control (HT29-SCR) se tratan durante 24 y 48 h con cisplatino (CsPt a 10 y 25 µM), oxaliplatino (OxPt a 50 y 100 µM) y 5-fluorouracilo (5FU a 150 µM). La viabilidad celular se cuantifica mediante el método de AlamarBlue®. Todos los tratamientos en cada línea se normalizan con respecto al tratamiento control con DMSO, representándose la media ± SEM. Las diferencias estadísticas se obtuvieron de la comparación entre líneas (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) y entre tratamiento quimioterapéutico al control con DMSO (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$). (G) Análisis de las proteínas DUSP10, p38 y p-p38 en la línea HT29-EV/DUSP10 tratadas durante 24 h con CsPt (25 µM), OxPt (100 µM) y 5FU (50 y 150 µM).

Siguiendo el mismo objetivo, seleccionamos otros compuestos como el erlotinib (ERT), gefitinib (GFT), topotecan (TPT) y camptotecina (CPT), comúnmente utilizados en quimioterapia. Todos estos quimioterapéuticos redujeron significativamente la viabilidad celular a las 48 y 72 h en la línea HT29-EV. Al compararla con las células HT29-DUSP10, los tratamientos con CPT y 5FU incrementaron la resistencia de esta línea a las 48 h (**Figura R-28A**). Del mismo modo, se encontró una ligera menor susceptibilidad en HT29-EV a ERT y GFT a las 72 h (**Figura R-28B**). Estos mismos estudios se realizaron en tres de las cinco líneas silenciadas para DUSP10 (HT29-shDUSP10). A las 48 h, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular al comparar HT29-shDUSP10 respecto a HT29-SCR en presencia de los diferentes quimioterapéuticos, exceptuando una ligera tendencia a una menor viabilidad con el 5FU (**Figura R-28C**). A las 72 h, sólo se encontró una significativa y mayor susceptibilidad de las líneas HT29-shDUSP10 al GFT (**Figura R-28D**). Finalmente, analizamos los niveles de expresión de DUSP10, YAP1, p38 y p-p38 con estos nuevos compuestos. Los resultados fueron variables. Observamos como todos los tratamientos en las líneas control, HT29-EV y HT29-SCR, aumentaron la expresión de DUSP10 y YAP1 sin variar mucho la expresión de p-p38. Como ya habíamos visto en respuesta a otros estreses en la línea HT29-DUSP10, la expresión de DUSP10 correlacionó con la expresión de YAP y se detectó menos p-p38 que en la línea HT29-EV (**Figura R-28E y R-28F**).

6.3. Inducción de genes asociados a la ruta Ca^{2+} /COX/PG/DUSP10 por estrés osmótico.

El estrés osmótico o hiperosmosis afecta a diferentes vías de respuesta implicadas en la supervivencia o muerte celular, además de un incremento en la inflamación que favorecería la aparición de una amplia variedad de enfermedades incluyendo IBD y cáncer (Brockner et al., 2012). Debido a ello, estudiamos la posible inducción de los genes asociados a la ruta Ca^{2+} /COX/PG/DUSP10 en el estrés osmótico. Al tratar la línea HT29-lucD6 con NaCl provocando una hiperosmosis en el medio de cultivo, observamos una alta inducción de los genes *DUSP10*, *PTGS1*, *mPGES1*, *PGFS*, *NFATc1*, *p21* y *RCAN1*. Del mismo modo, se encontró un aumento moderado de la expresión de los genes *PTGS2*, *NFATc4* y *NFAT5* (un gen diana conocido del estrés osmótico). Sin embargo, no se encontró inducción de los genes *mPGES2*, *NFATc2* y *NFATc3* (**Figura R-29A**).

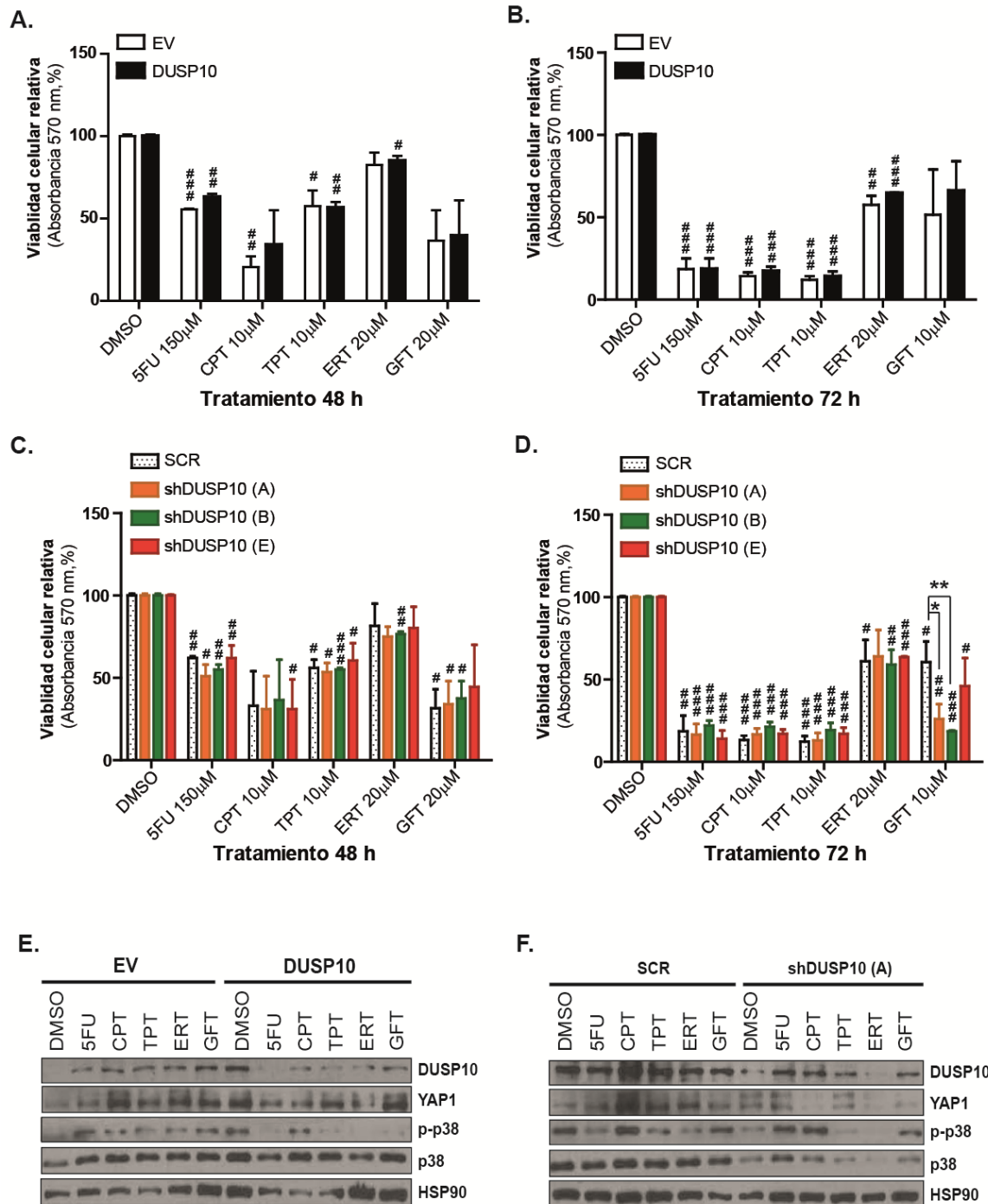


Figura R-28. Viabilidad celular dependiente de la resistencia a quimioterapéuticos como CPT, TPT, ERT y GFT en función de la expresión de DUSP10. Análisis de la viabilidad celular mediante el método de MTT en (A-B) células HT29-lucD6 sobreexpresando DUSP10 (HT29-DUSP10) y su línea control, (C-D) tres líneas con DUSP10 silenciado (HT29-shDUSP10) y su líneas control (HT29-SCR) tras el tratamiento con camptotecina (CPT, 10 µM), erlotinib (ERT, 20 µM), topotecan (TPT, 10 µM), gefitinib (GFT, 10 µM) y 5FU (150 µM) durante 48 y 72 h. Se representa la media \pm SEM y se normaliza cada línea al tratamiento control (DMSO). Se compara estadísticamente cada tratamiento entre las líneas (* p <0.05; ** p <0.01) y en cada línea cada tratamiento respecto al tratamiento control (# p <0.05; ## p <0.01; ### p <0.001). (E-F) Detección de las proteínas DUSP10, YAP1, p38 y p-p38 en las líneas HT29-EV/DUSP10 y en las líneas HT29-SCR/shDUSP10(A) tras ser tratadas con los mismos compuestos y concentraciones ya descritas durante 24 h.

A continuación, analizamos la cinética de activación por fosforilación de las kinasas dependientes de estrés, JNK y p38, tras el tratamiento con NaCl. En la línea HT29-EV, la fosforilación de p38 y JNK aumentó desde los primeros 10 min de tratamiento con respecto al tiempo inicial (sin tratamiento). Sin embargo, la fosforilación de p38 en HT29-DUSP10 se retrasó hasta los 30 y 60 min, siendo siempre más leve que en HT29-EV y “apagándose” mucho antes. Al contrario, la cinética de fosforilación de JNK no varió entre HT29-EV y HT29-DUSP10 (**Figura R-29B**).

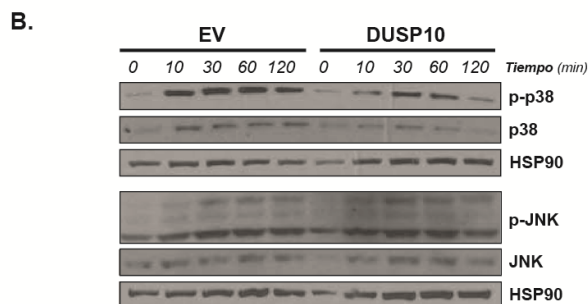
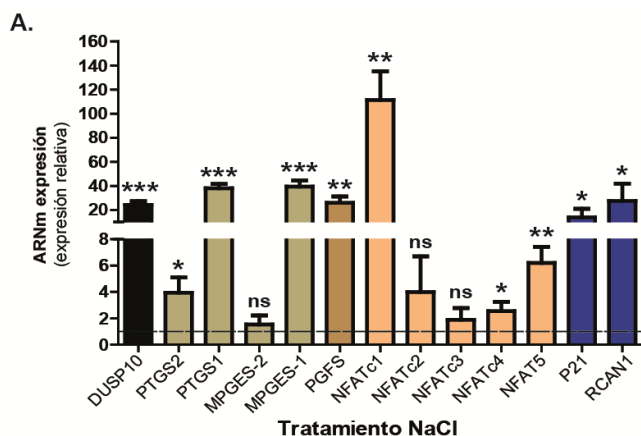


Figura R-29. Respuesta al estrés osmótico por NaCl. (A) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes como DUSP10, PTGS2, PTGS1, MPGES-1, MPGES-2, PGFS, NFATc1-4, NFAT5, p21 y RCAN1 tras un tratamiento durante 24 h con 100 mM de NaCl. Se muestra la media \pm SEM de las veces de inducción de cada gen en la línea tratada con respecto a la línea sin tratamiento (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significativo). (B) Detección mediante WB de los niveles de p38 y JNK fosforilado y total en las líneas HT29-EV y HT29-DUSP10 tras el tratamiento con NaCl a 100 mM durante una cinética de tiempo de 10, 30, 60 y 120 min.

6.4. Implicación de DUSP10 en el estrés fisiológico por privación de suero.

En primer lugar nos propusimos estudiar si la ausencia de suero estaría afectando la expresión de DUSP10 en la línea HT29-lucD6. Observamos que la expresión de *DUSP10* aumentó de manera significativa 3.5 y 53.8 veces a las 48 y 72 h, respectivamente, de privación de suero (**Figura R-30A**). Los niveles de la proteína DUSP10 fueron incrementándose desde las 3 h hasta las 48 h sin suero (**Figura R-30B**). Sin embargo, el aumento de DUSP10 a las 48 h en HT29-EV disminuyó a las 72 h, mientras que en HT29-DUSP10 no varió en los diferentes tiempos. A la vez, detectamos un incremento en la fosforilación de p38 en la línea HT29-EV sin suero dependiente del tiempo, siendo este aumento

menor en HT29-DUSP10 (**Figura R-30C**). Comprobamos como en las líneas HT29-shDUSP10, lógicamente, apenas se induce *DUSP10* tras 24, 48 y 72 h sin suero (**Figura R-30D**). En estas mismas líneas se detectaron niveles más altos de p-p38 en todos los tiempos sin suero, especialmente teniendo en cuenta que los niveles de p38 totales disminuyeron muy significativamente en las líneas HT29-shDUSP10, por lo que el ratio p-p38/p38 aumentó considerablemente (**Figura R-30E**).

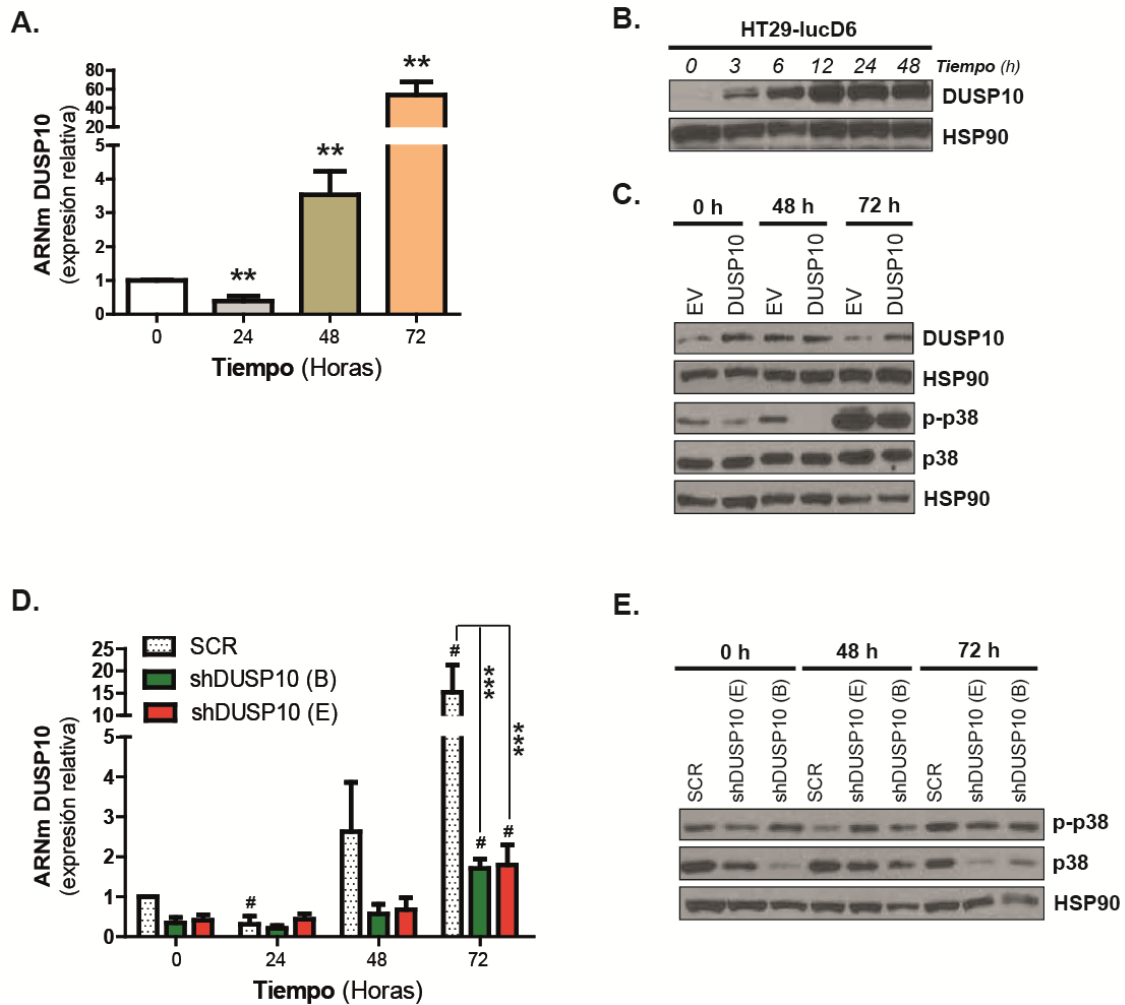


Figura R-30. Inducción de *DUSP10* en respuesta al estrés provocado por la falta de suero. (A) Análisis de las veces de inducción de ARNm de *DUSP10* en la línea HT29-lucD6 tras 24, 48 y 72 h de privación de suero por RT-qPCR. Se representa la media \pm SEM de 4 experimentos independientes y se normaliza con respecto al tiempo 0 (** $p < 0.01$). (B) Detección de *DUSP10* tras privar a las células HT29-lucD6 de suero durante 3, 6, 12, 24 y 48 h por WB. (C) Detección de *DUSP10*, p-p38 y p38 en la línea HT29-EV y HT29-DUSP10 tras 48 y 72 h en ausencia de suero por WB. (D) Análisis de ARNm de la expresión de *DUSP10* en la línea HT29-shDUSP10 (B y E) y HT29-SCR durante 24, 48 y 72 h sin suero por RT-qPCR. Se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes y se normaliza con respecto al tiempo 0 (** $p < 0.01$). (E) Detección de p-p38 y p38 en las líneas HT29-shDUSP10 (E y B) y HT29-SCR por WB tras privar del suero durante 48 y 72 h. Se muestran geles representativos de 3 experimentos independientes.

Analizamos la respuesta en proliferación y supervivencia de la línea HT29-lucD6 ante el estrés provocado por la ausencia de suero dependiente de la expresión de DUSP10. El número de células en la línea HT29-DUSP10 fue mayor que en la línea HT29-EV durante todos los días de contaje (**Figura R-31A**). Por el contrario, se contaron un menor número de células en las líneas HT29-shDUSP10 durante todos los días de contaje (**Figura R-31B**). También, encontramos una mayor incorporación de timidina-³H a distintos tiempos en la línea HT29-DUSP10 y menor en HT29-shDUSP10 (E) (**Figura R-31C y R-31D**). El análisis del ciclo celular mostró pocas diferencias significativas a 48 y 72 h. En general, se observó una disminución de células HT29-DUSP10 y un aumento de células HT29-shDUSP10 en fase G0/G1 (**Figura R-31E y R31F**). Por el contrario, en las líneas HT29-shDUSP10 parece existir un aumento de células en fase S más importante a 72 h y una tendencia similar en HT29-DUSP10 a 48 y 72 h (**Figura R-31G y R-31H**).

Estudiamos si la expresión de las proteínas de ciclo celular ciclinas D (D1 y D3), CDK (CDK4 y CDK2) y CKI (p18, p21 y p27), implicadas principalmente en la fase G1 y S, podría estar alterada por la falta de suero y/o la expresión de DUSP10. Comprobamos que la proteína DUSP10 incrementó con el tiempo sin suero en la línea control y dicho estrés no modificó su expresión en la línea con DUSP10 sobreexpresado. En HT29-DUSP10 observamos que la expresión de las ciclinas D1 y D3 aumentó a las 12 y 24 h, mientras que en HT29-EV ocurrió a las 3 y 6 h. Por el contrario, la expresión de CDK4 y su inhibidor p18 no varió entre HT29-EV y HT29-DUSP10. No obstante, a las 48 h se detectó que la expresión de estas tres proteínas ya analizadas, con más importancia en la fase G1 del ciclo celular, disminuyó volviendo al nivel de expresión del tiempo inicial (T0). Del mismo modo, estudiamos CDK2 y dos de sus inhibidores, p21 y p27, todos ellos implicados mayoritariamente en la entrada y salida de la fase S del ciclo celular. En HT29-DUSP10 vimos que la expresión de CDK2 aumentó a las 12, 24 y 48 h, mientras que no varió en HT29-EV. Respecto a los inhibidores de CDK2, vimos que la expresión de p21 en ambas líneas a las 24 y 48 h, aunque siendo menor en HT29-DUSP10. Por otro lado, la expresión de p27 incrementó hasta las 12 h en HT29-EV, mientras que dicho incremento se detectó levemente en HT29-DUSP10 a las 6 y 12 h con una máxima expresión a las 24 h, pero siempre menor que en HT29-EV (**Figura R-32A**).

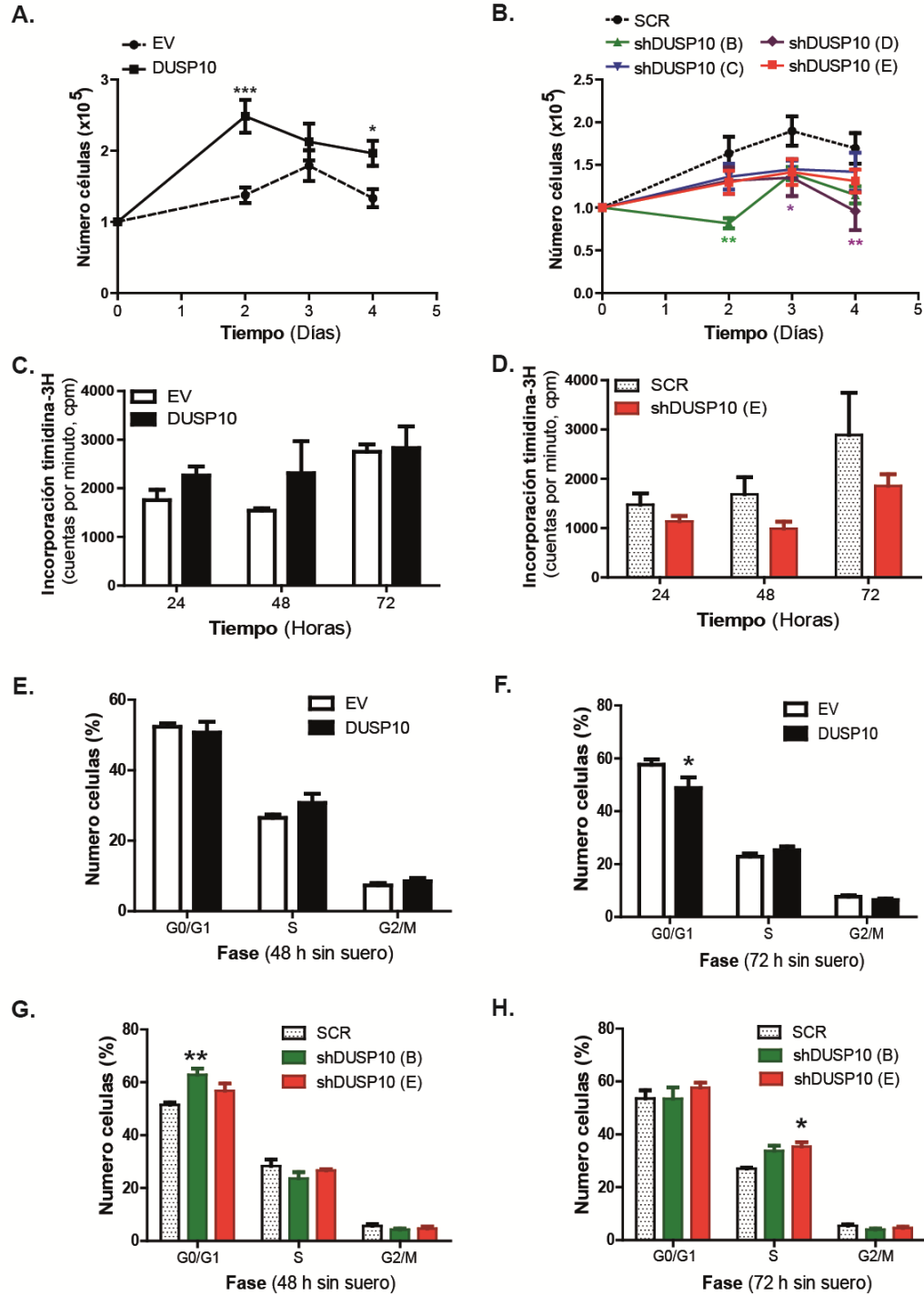


Figura R-31. Variaciones en la proliferación en ausencia de suero en función del tiempo y la expresión de DUSP10. (A-B) Análisis de la variación en el número de células durante 4 días de crecimiento en ausencia de suero mediante conteo celular de la línea HT29-EV vs. HT29-DUSP10 y HT29-SCR vs. HT29-shDUSP10. Se compara cada línea con DUSP10 sobreexpresado o silenciado respecto a la línea control en cada tiempo (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). **(C-D)** Incorporación de timidina tritiada (3H-timidina) para el estudio de la capacidad de síntesis de ADN. Se representa el número total de cuentas por minuto (cpm) de las líneas HT29-EV/DUSP10 y HT29-SCR/shDUSP10 durante 24, 48 y 72 h en medio de cultivo sin suero. **(E-F)** Análisis de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular tras 48 y 72 h en ausencia de suero de células HT29-EV/DUSP10 y HT29-SCR/shDUSP10. **(G-H)** Los ciclos celulares representan 6 experimentos independientes y se compara con respecto a la línea control dentro de cada fase (*p<0.05; **p<0.01).

En HT29-shDUSP10 (E) no encontramos un efecto claramente opuesto. La expresión de la ciclina D1 fue mayor desde el momento inicial y, en general, se mantuvo su nivel de expresión a lo largo del tiempo en HT29-shDUSP10 (E) en comparación con HT29-SCR. De la misma manera, tanto los niveles de las proteínas ciclina D3 como CDK4 aumentaron más en HT29-shDUSP10 (E). Por el contrario, no se encontraron diferencias en la cinética de expresión de p18 entre la línea HT29-SCR y HT29-shDUSP10 (E). En el caso de CDK2, se observó una disminución en la expresión en HT29-shDUSP10 (E) tras 24 y 48 h respecto a T0. La expresión de p21 fue detectada a las 24 y 48 h en HT29-SCR, siendo menor en HT29-shDUSP10 (E), de igual forma que ocurrió cuando se analizó la línea HT29-DUSP10. La expresión de p27 parece aumentar a tiempos intermedios en contraste a la disminución de la misma en la línea HT29-DUSP10 (**Figura R-32B**). Los análisis a tiempos más largos en ausencia de suero mostraron que la sobreexpresión DUSP10 mantiene elevado CDK2 por más tiempo, mientras que en la línea HT29-shDUSP10 disminuyó mucho la expresión de CDK2 a 48 y 72 h. Al mismo tiempo, la inducción de p21 tras la ausencia de suero se mantuvo inhibida tanto por la sobreexpresión como por el silenciamiento de DUSP10 (**Figura R-32C y R-32D**).

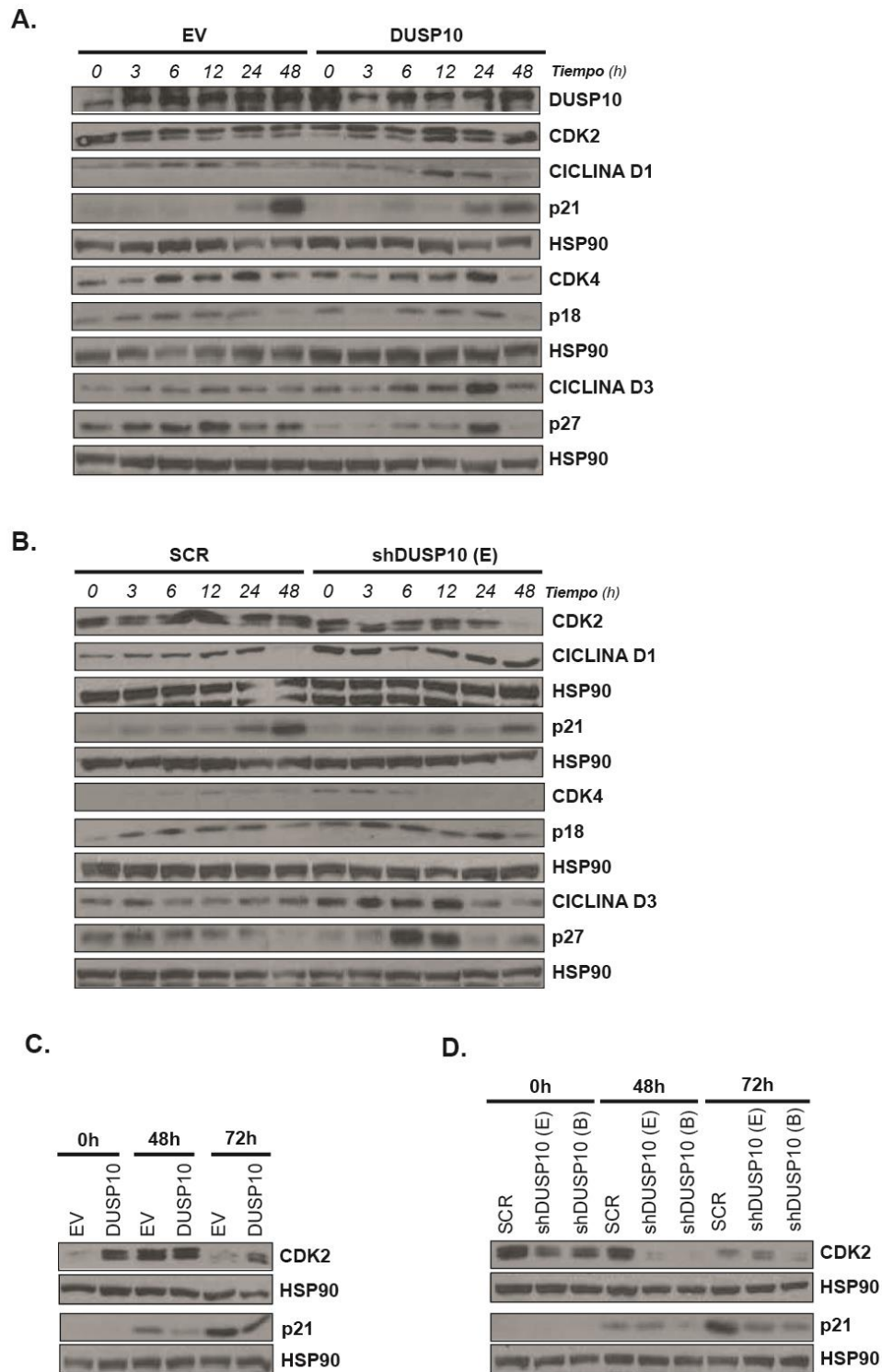


Figura R-32. Las expresiones de ciclinas, CDK y CKI implicadas en la regulación de la fase G1 y S del ciclo celular en función del tiempo de privación de suero y expresión de DUSP10. (A-B) Detección de la expresión de las proteínas CDK2, CDK4, ciclina D1 y D3, p21, p27 y p18 por WB en las líneas HT29-DUSP10 y HT29-shDUSP10 (E) y sus respectivas líneas control, HT29-EV y HT29-SCR, tras la privación de suero durante una cinética de tiempo de 3, 6, 12, 24 y 48 h. El punto experimental control fue el medio completo con suero a las 0 h de tratamiento. **(C-D)** Análisis de la expresión de CDK2 y p21 en la línea HT29-DUSP10 y en las dos líneas HT29-shDUSP10 (E y B) tras 48 y 72 h de ausencia de suero. En todos los casos se muestran geles representativos de 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

1. Relación de DUSP10 y YAP1 con la actividad de COX2/PG en el CCR.

La activación de la ruta $\text{Ca}^{2+}/\text{CaN}/\text{NFAT}/\text{COX2}$ juega un papel importante en el desarrollo del CCR tanto por su implicación en la inflamación como en el propio desarrollo del tumor (Daniel et al., 2014; Duque et al., 2005; Lakshmikuttyamma et al., 2005; Mancini and Toker, 2009; Rizzo, 2011). El objetivo de nuestro laboratorio ha sido identificar las posibles moléculas efectoras de esta ruta, lo que nos llevó a estudiar en esta tesis a DUSP10. Tras un análisis inicial en bases de datos observamos que DUSP10 podría estar implicado en el CCR, por lo que analizamos su papel a través de diferentes modelos experimentales y en muestras de pacientes.

La línea HT29 de CCR ha sido utilizada como principal modelo *in vitro* porque expresa de manera endógena COX2, aunque a niveles bajos de proteína y ARNm debido a que es degradada rápidamente por el proteasoma (Shao et al., 2000), siendo un buen modelo para el estudio de la proliferación, el ciclo celular y la respuesta a AINES (Shiff et al., 1995). Por tanto, utilizamos esta línea para sobreexpresar COX2 e identificamos a DUSP10 como un gen inducido por la actividad de COX2, donde su expresión es inhibida por eterocoxib o aspirina. La inducción de DUSP10 fue comprobada en otras líneas de CCR como SW480 y SW620.

La alteración del gen supresor de tumores *APC* es crucial en el desarrollo del CCR, entre otras razones porque promueve la expresión de COX2 (Hsi et al., 1999). COX2 media su acción pro-tumoral a través de las PG en el tejido tumoral, promoviendo la iniciación y/o progresión de la carcinogénesis (Rizzo, 2011). En el CCR, la mayoría de los estudios indican que PGE_2 es la principal PG responsable de la acción pro-tumoral de COX2 (Greenhough et al., 2009). Sin embargo, existen muy pocas evidencias del posible papel de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el cáncer, más concretamente en el CCR, excepto la presencia de niveles más altos junto con los de PGE_2 (Nugent et al., 1996; Poczobutt et al., 2013), así como una expresión diferencial del receptor FP dependiente del estadio del tumor (Gustafsson et al., 2007). Ambas PG, PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$, colaboran en la invasión y la movilidad de las células tumorales (Qualtrough et al., 2007). Nuestros resultados muestran que DUSP10 es inducido por PGE_2 a través de los receptores EP1 y EP4, y por $\text{PGF}_{2\alpha}$ por medio del receptor FP. La señalización por medio de EP4 incrementaría el AMPc de la célula, mientras que EP1 y FP promoverían principalmente la movilización de Ca^{2+} intracelular (Fujino and Regan, 2003; Loffler et al., 2008; Regan, 2003), aunque ha sido descrito que EP1 no moviliza el Ca^{2+} intracelular en las células HT29 (Cassano et al., 2000). Además, la expresión de EP4 en las células mieloides del intestino promueve la formación de tumores de colon en ratones *APC^{min}* (Chang et al., 2015). Por tanto, sería más plausible pensar que la inducción de DUSP10 dependiente de la acción

combinada de PGE₂ y PGF_{2α} fuera a través de EP4 y FP, movilizando tanto AMPc como Ca²⁺ (Collins et al., 2009; Koukoui et al., 2006). Esto se debería a que la transcripción de DUSP10 estaría regulada por factores de transcripción como NFAT, dependiente de Ca²⁺/calcineurina (Corral et al., 2007); CREB, activados por la señalización de AMPc (Hawcroft et al., 2007); o NF-κB, inductores de COX2 por diferentes estímulos o factores dependientes de la vía RAS-RAF-MAPK (Luo et al., 2012; Vila-del Sol and Fresno, 2005). Debido a que la señalización por PGE₂ y PGF_{2α} estaría induciendo también la expresión de COX2 (Diaz-Munoz et al., 2012; Stamatakis et al., 2015), nuestros resultados indicarían que la expresión de DUSP10 estaría regulada por medio de una retroalimentación positiva de la ruta PG/Ca²⁺+AMPc/COX2/PG.

2. El papel pro-tumoral de DUSP10 en el desarrollo del CCR junto a COX2 y YAP1.

DUSP10 es una fosfatasa que regularía tanto JNK como p38, mientras que no lo hace sobre ERK (Theodosiou et al., 1999). Aunque otros autores han descrito que DUSP10 puede interaccionar y desfosforilar a ERK (Nomura et al., 2012). Nuestros resultados indican que DUSP10 preferentemente desfosforila a p38 pero no a JNK ni a ERK en las células HT29.

En nuestro caso, la expresión de DUSP10 se relacionó con una mayor proliferación y un mayor número de colonias *in vitro*. En células MEF inmortalizadas se ha descrito que la ausencia de expresión de p38 provoca una mayor proliferación al alcanzar el contacto celular (Faust et al., 2005). En el cáncer de mama, la activación de p38 induce la expresión de COX2, al estabilizar el factor de transcripción CREB, y promueve la carcinogénesis (Gauthier et al., 2005; Shafer and Slice, 2005). La ausencia de expresión de p38 en ratones también se relaciona con un menor desarrollo de tumores pero ligado a una menor inflamación (Gupta et al., 2014). Por otra parte, es posible que la falta de p38 activo en las primeras etapas del desarrollo de los tumores no permita la inducción de la expresión de COX2 en las células epiteliales intestinales e indirectamente, por tanto, el aumento de la expresión de DUSP10, explicando de esta manera el menor desarrollo de tumores.

En el CCR se ha descrito como *DUSP10* está sobreexpresado (Nomura et al., 2012). Además, determinados polimorfismos en *DUSP10* aumentan el riesgo de sufrir CCR (Zhang et al., 2014a). Nuestros estudios *in silico* en cohortes de pacientes mostraron como *DUSP10* es un gen que se expresa tanto en cáncer de colon como en cáncer de recto. Del mismo modo, años atrás se identificó que el gen *PTGS2*, que codifica para COX2, se encuentra sobreexpresado en el 85% de los adenomas y adenocarcinomas de colon (Eberhart et al., 1994). La detección de COX2 y DUSP10 en nuestra

cohorte de pacientes con CCR confirmó, por vez primera, que ambas proteínas se expresan altamente en el epitelio tumoral y que sus niveles de expresión correlacionan, de acuerdo con nuestros resultados *in vitro* en las líneas de CCR.

Algunos autores afirman que tanto una menor expresión de p38 en las células epiteliales tumorales de los pólipos adenomatosos de colon en pacientes como una inactivación de p38 en los enterocitos de las criptas promueve la formación de tumores (Hardwick et al., 2001; Wakeman et al., 2012). Otros autores muestran que la eliminación genética de DUSP10 en ratones se asocia con un mayor desarrollo tumoral a través de la regulación de ERK (Png et al., 2016). Esto podría deberse a que DUSP10 estaría regulando de manera indirecta la activación de ERK por medio de p38 (Finch et al., 2012). En nuestra cohorte de pacientes con cáncer de colon correlacionamos positivamente la expresión de DUSP10 en las células epiteliales tumorales con la ausencia de p38 fosforilado. Además, vimos como la alta expresión de DUSP10 nuclear se asocia con una menor supervivencia de los pacientes. En consecuencia, DUSP10 asociado a la desfosforilación de p38 y a su presencia en el núcleo estaría implicado en una mayor proliferación y un rápido crecimiento tumoral del CCR.

La relación entre la inflamación intestinal y el desarrollo de CCR está claramente demostrada (Bae and Kim, 2014; Jess et al., 2012; von Roon et al., 2007). Por ello, realizamos un estudio piloto de la expresión de DUSP10, COX2 y COX1 en pacientes con IBD, el cual mostró que dichas proteínas se expresaban de forma diferencial en las criptas colónicas. Encontramos tendencia a la co-expresión de las proteínas en las células de la zona lateral y basal de la cripta. Además, observamos una tendencia en la expresión de DUSP10 ligada a la expresión de COX1 en los enterocitos de los pacientes con IBD. Por otra parte, el análisis del *array* de expresión génica en pacientes con CU (Noble et al., 2008) puso de manifiesto una mayor expresión de *DUSP10* y *YAP1*, y una menor expresión de *MAPK14*, *PTGER4*, *PTGS1* y *PTGS2*. La posible acción antiinflamatoria de DUSP10 en las etapas iniciales del CCR podría explicar resultados, aparentemente contradictorios con los nuestros, que conceden a la actividad fosfatasa de DUSP10 el papel de supresor tumoral en el colon de ratones genéticamente deficientes para este gen (Png et al., 2016). Utilizando el mismo modelo con AOM/DSS, vimos como la expresión de DUSP10 y YAP1 no se produjo en el epitelio durante la inflamación del colon tras el tratamiento sólo con DSS. En los tumores inducidos tras el proceso de CAC, observamos que las proteínas DUSP10 y YAP1 se expresaban altamente en el citoplasma y núcleo del tejido epitelial tumoral y, en menor medida, en las células epiteliales de las criptas adyacentes. Otros autores han descrito una distribución diferencial de YAP en las criptas colónicas. YAP se detecta en el citoplasma de las células

situadas en las zonas altas de las criptas, mientras que se concentra en el núcleo en las células madre intestinales (ISC) localizadas en la base de dichas criptas (Barry et al., 2013; Zhou et al., 2011). Al mismo tiempo, la expresión de YAP es dispensable en la homeostasis del intestino debido a que su eliminación no varía la proliferación, estructura o función del órgano, mientras que en las ISC sí es importante porque promueve la regeneración intestinal y la iniciación del cáncer (Cai et al., 2010; Gregorieff et al., 2015). Todos estos resultados podrían estar indicando que la inducción de DUSP10 estaría mediada preferentemente por COX1 en las etapas iniciales y previas al CCR, actuando como un mecanismo para controlar la inflamación producida por el estrés intestinal. En este estadio, la actividad fosfatasa de DUSP10 evitaría la activación de p38, disminuyendo la expresión de las enzimas COX en el intestino y, en consecuencia, la inflamación. Sin embargo, tras el cúmulo de mutaciones (con el AOM en ratones), DUSP10 tendría un papel pro-tumoral debido a que induciría la expresión de YAP1, manteniéndolo en el núcleo y evadiendo la IPC, lo que finalmente resultaría en una mayor tumorigénesis. Por tanto, DUSP10 tendría un papel complejo que, junto a YAP1, promovería la formación de tumores dependientes de un proceso de inflamación crónica como el ocurrido en el CAC.

Estímulos de estrés que activan la vía de p38 como el estrés osmótico, inducen la expresión de DUSP10 en las células NIH3T3 (Tanoue et al., 1999). Nuestros resultados en células de CCR indican que la hiperosmosis fue capaz de inducir *DUSP10*, probablemente a través de un mecanismo de compensación reguladora. En la línea HT29 bajo condiciones de estrés osmótico inducido por NaCl, la actividad fosfatasa de DUSP10 regula negativamente la fosforilación de p38 pero no de JNK, confirmando que DUSP10 desfosforila específicamente a p38 en líneas de CCR. Se ha publicado que p38 es una diana del estrés osmótico y su activación regula la expresión de COX2 (Cheng et al., 2000). Nuestros resultados mostraron que la hiperosmosis indujo también la expresión de *PTGS2*, *PGFS* (sintasa implicada en la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$) y *NFATc1* (factor de transcripción dependiente de Ca^{2+}). Esta inducción génica en respuesta a la hiperosmosis en células HT29 indicaría una activación de la ruta $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{Ca}^{2+}/\text{NFAT}/\text{COX2}/\text{DUSP10}$ que se confirmaría por la activación del gen diana de la ruta RCAN (Park et al., 2009). Al mismo tiempo, demostramos por primera vez una fuerte inducción de *PTGS1* por estrés osmótico en células epiteliales de CCR. El gen *PTGS1*, que transcribe para la enzima COX1, es considerado un gen constitutivo por lo que no se considera inducible, aunque han sido descritos algunos ejemplos de su inducción transcripcional (Bunimov et al., 2007; Hamasaki et al., 1993; Zidar et al., 2009). La inducción de *PTGS1* por el estrés osmótico merece ser explorada en el futuro como opción terapéutica, ya que su incremento por agentes osmóticos no irritantes podría

resultar en una mejor protección del epitelio intestinal en respuesta a agentes terapéuticos clásicos como los AINES. Además, dado el papel antiinflamatorio y/o protector de DUSP10 en las fases iniciales de la inflamación intestinal, estos agentes osmóticos podrían explorarse como antiinflamatorios.

Por otro lado, la proteína YAP1 se ha detectado en el núcleo de las células epiteliales intestinales de adenomas espontáneos de ratones *APC*^{-/-} (Cai et al., 2015). YAP1, a través de la inducción de COX2, promueve la proliferación y la supervivencia en las células de Schwann (Guerrant et al., 2016). Además, PGE₂ induce la expresión de YAP1 por medio de un incremento en la expresión de COX2 y EP4, promoviendo la proliferación celular de la línea SW480 (Kim et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados en células HT29 mostraron que únicamente el tratamiento con PGF_{2α} y la movilización de Ca²⁺, a través de la activación de FP, indujo la expresión de YAP1. Las diferencias respecto a la inducción PGE₂ podrían deberse a la diferente línea celular empleada, aunque nosotros comprobamos que las células HT29 respondían a PGE₂, vía EP4, en la inducción de DUSP10. Al mismo tiempo, aumentó la presencia en el núcleo de YAP1 y DUSP10. La inducción de YAP1 por Ca²⁺ no había sido descrita hasta ahora y, dada la promiscuidad de la señalización de Ca²⁺ a través de múltiples receptores, hace que sea necesario explorar esta ruta en profundidad en otros sistemas donde YAP1 juega un papel clave en el control del crecimiento. Es posible que esta acción del Ca²⁺ sobre YAP1 sea indirecta, vía inducción de DUSP10. En base a lo obtenido, podríamos apuntar a que COX2 actuaría como un inductor de YAP1 y DUSP10 a través de PGF_{2α}, a la vez que YAP1 induciría la expresión de COX2, promoviendo de este modo una retroalimentación en la tumorigénesis.

Diversos autores han descrito como la sobreexpresión de YAP se relaciona con una mayor proliferación y metástasis, menor supervivencia y peor pronóstico en pacientes de CCR (Hu et al., 2014; Wang et al., 2013b). En estos casos, YAP aparece tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, restringida su expresión a las células basales de la cripta en el tejido normal y muy altamente expresada en todas las células del tejido tumoral (Steinhardt et al., 2008). La acumulación de YAP1 en el núcleo se asocia con una menor supervivencia, especialmente en pacientes en estadios tempranos del cáncer (Kang et al., 2011). Nuestros resultados mostraron que YAP estaba altamente expresada en el citoplasma y en el núcleo de las células tumorales tanto en los xenoinjertos de las líneas celulares en los ratones como en las muestras de los pacientes. Por primera vez correlacionamos la alta expresión de YAP1 con una alta localización nuclear de DUSP10. En los cánceres de colon, pulmón y páncreas con mutaciones activadoras de *KRAS* se ha descrito que YAP1 se expresa con el fin promover la progresión neoplásica de los tumores (Kapoor et al., 2014; Shao et

al., 2014; Zhang et al., 2014b). Una de las alteraciones características de la línea HT29 es la mutación activadora en *BRAF*, mientras que la línea HCT116 es la mutación activadora en *KRAS*. Estas mutaciones en las líneas celulares explicarían por qué los tumores producidos a partir de xenoinjertos HT29 y HCT116 expresaban YAP en igual cantidad a tiempo final de experimento, independientemente de la expresión de DUSP10. Este hecho apunta a que YAP compensaría no sólo las mutaciones en *KRAS* sino también en *BRAF*. Por tanto, la expresión de YAP1 se volvería indispensable en el desarrollo tumoral tras haberse producido las mutaciones clave para la carcinogénesis.

3. Interacción de DUSP10 y YAP1.

Analizamos el mecanismo por el cual YAP1, p38 y DUSP10 podían estar interactuando. Dado que la característica principal de p38 es su activación por estímulos de estrés, sometimos a la línea celular de CCR a varios estreses, principalmente aquellos asociados al fenotipo tumoral.

El contacto celular se considera una señal anti-proliferativa mediada por la interacción célula-célula (Eagle and Levine, 1967). Una de las características de las células transformadas es la pérdida de la IPC (Abercrombie, 1979). En células no transformadas en baja densidad celular, YAP1 se encuentra desfosforilado, en el núcleo, actuando como un co-factor de transcripción y promoviendo la proliferación. Por el contrario, cuando las células alcanzan el contacto celular y se induce la IPC en AD, YAP1 se transloca del núcleo al citoplasma, aparece mayoritariamente fosforilado, inactivo y deteniendo la proliferación (Zhao et al., 2007). Nuestros resultados mostraron como la AD induce tanto la expresión de DUSP10 como la de YAP1, siendo la expresión de YAP1 dependiente de la expresión de DUSP10 en las líneas de CCR. Detectamos que la AD provocó un aumento en los niveles de fosforilación del residuo Ser127 de YAP1, como sería esperable en células no transformadas y, al mismo tiempo, una menor fosforilación de p38. El aumento de p-YAP¹²⁷ podría deberse a que la AD activa la ruta canónica dependiente de LATS e inactiva YAP por fosforilación (Zhao et al., 2007). También, la fosforilación de YAP podría darse por otras rutas como la activación de JNK y AKT, lo que conllevaría a la inducción de apoptosis (Basu et al., 2003; Danovi et al., 2008). Otras kinasas como CDK1 y NDR también pueden fosforilar a YAP y promover una menor proliferación y tumorigénesis (Yang et al., 2013; Zhang et al., 2015a). Por tanto, la fosforilación de YAP en nuestras líneas de CCR podría deberse a la acción de estas kinasas de manera dependiente a la condición de AD e independiente a la expresión de DUSP10.

Otra manera de regular la activación de YAP es a través de la actividad de algunas fosfatasa. En células epiteliales de mama se ha descrito que la fosfatasa PTPN14 se induce de manera dependiente de AD y promueve la translocación de YAP del núcleo al citoplasma, suprimiendo de esta manera la proliferación celular (Wang et al., 2012). Por el contrario, en células de cáncer de ovario se ha descrito que la fosfatasa PP1 puede reactivar a YAP por desfosforilación (Wang et al., 2011). Nuestros resultados mostraron como la AD induce la translocación parcial de DUSP10 y YAP1 al núcleo, relacionando por vez primera la cantidad de YAP1 en el núcleo con los niveles de expresión de DUSP10. Al mismo tiempo, también detectamos niveles de p-YAP¹²⁷ tanto en el citoplasma como en el núcleo, los cuales también correlacionaron con la presencia de DUSP10. Sin embargo, a pesar de estar fosforilado, YAP1 sigue estando en el núcleo y no se degrada, probablemente debido a que su asociación con DUSP10 lo retendría y lo mantendría activo evitando la IPC. Así pues, hemos visto por vez primera una discrepancia entre la presencia de YAP1 en el núcleo y su estado de fosforilación. En células tumorales HeLa se ha descrito que el residuo Ser127 de YAP es resistente a la desfosforilación, pudiendo permanecer fosforilado tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células independientemente de la densidad celular (Zhao et al., 2007).

En vista a la relación entre DUSP10 y YAP1 en respuesta a AD, p38 podría estar influyendo en la activación de YAP como afirman algunos autores, aunque lo han atribuido a efectos indirectos. Así, en cáncer de hígado, la tumorigénesis puede ser promovida por YAP a través de la regulación negativa de p38 que estabiliza al factor de transcripción CREB (Wang et al., 2013a). Nuestros resultados mostraron como YAP1 estaba interaccionando tanto con DUSP10 como con p38, aunque dicha interacción podría ser mediada por la unión de p38 a ambas proteínas o por la unión de DUSP10 a las otras dos. En cualquier caso, podría darse una regulación conjunta entre DUSP10, YAP y p38 en las líneas de CCR, donde DUSP10 podría regular negativamente a p38 y positivamente a YAP1 por desfosforilación. Demostramos como la regulación de YAP y p38 afectó a la proliferación celular de manera opuesta en las líneas de CCR. La inhibición de YAP con VP, favoreciendo su retención en el citoplasma, redujo la proliferación de las células (Wang et al., 2016). Por el contrario, el inhibidor de p38, que podría mimetizar la actividad fosfatasa de DUSP10, promovió positivamente la proliferación celular (Barone et al., 2001).

En células epiteliales de mama se ha identificado como la sobreexpresión de YAP revierte la IPC causada por la expresión de E-CDH. Al mismo tiempo, la ausencia de expresión de β -catenina induce menor p-YAP¹²⁷ y su acumulación en el núcleo (Kim et al., 2011). Nuestros resultados mostraron como

la AD indujo E-CDH, cuyo nivel de expresión correlacionó con los niveles de expresión de DUSP10 en la línea HT29. La pérdida de la cohesión en el contacto célula-célula durante la invasión tumoral conlleva a la desfosforilación de YAP, E-CDH y β -catenina (Vlahov et al., 2015). Igualmente, la β -catenina desfosforilada unida a YAP promueve la patogénesis en el CCR a través de la transcripción de genes anti-apoptóticos (Rosenbluh et al., 2012). En este sentido, DUSP10 podría estar desfosforilando E-CDH, β -catenina y YAP, favoreciendo la unión de β -catenina a YAP, evadiendo la IPC y promoviendo la proliferación en AD de las células de CCR. Al mismo tiempo, la alta expresión de E-CDH en AD podría explicar la activación de la ruta Hippo dependiente de LATS y el aumento de p-YAP¹²⁷.

Al mismo tiempo, la privación del suero en el medio de cultivo provoca una falta de factores de crecimiento y, en consecuencia, las células responden deteniendo su crecimiento y permaneciendo en un estado de quiescencia (Khammanit et al., 2008). Nosotros demostramos por primera vez que la ausencia de suero induce la expresión de DUSP10 en las líneas de CCR. La expresión de DUSP10 en ausencia de suero se asoció con una mayor supervivencia y una desfosforilación de p38. En cardiomiocitos y fibroblastos p38 $\alpha^{-/-}$ se ha visto una mayor supervivencia a la falta de suero debido a una disminución de proteínas pro-apoptóticas y un aumento de p-ERK (Porras et al., 2004). DUSP10 actuaría como un regulador positivo de ERK a través de p38, mimetizando su actividad en respuesta a EGF y promoviendo la proliferación celular, como ha sido estudiado en células HeLa (Finch et al., 2012). Al mismo tiempo, la falta de glucosa en el microambiente tumoral induce la expresión de COX2 y un incremento en la producción de PGE₂, promoviendo la supervivencia de las células tumorales de cáncer de colon (Roberts et al., 2011). Todo ello haría que la sobreexpresión de DUSP10 favoreciera una mayor proliferación y supervivencia a la privación de suero en células de CCR.

4. Implicación de DUSP10 en la regulación del ciclo celular.

En general, la ausencia de suero y la confluencia provocan la detención de las células en fase G0 (Khammanit et al., 2008). Dado el efecto de DUSP10 en ambos fenómenos, analizamos la regulación de las proteínas de ciclo en respuesta a la confluencia y a la privación de suero en las líneas tumorales de CCR. Teniendo en cuenta que la ausencia de suero y la AD por sí mismas provocan un fuerte incremento de la expresión de DUSP10, los resultados obtenidos cuando se sobreexpresa o se silencia DUSP10 son difíciles de interpretar. Aunque se ha descrito en cardiomiocitos que tanto la ausencia de suero como el contacto celular provocan una reducción de la fosforilación de p38 (Zuluaga et al., 2007), hecho que podría explicarse por una inducción de DUSP10.

En fibroblastos, el contacto celular induce una menor expresión de CDK4 y CDK2, unido a una acumulación del inhibidor preferente de CDK2, p27 (Dietrich et al., 1997). Nuestros resultados mostraron que la AD induce la parada de las células en fase G0/G1, disminuyendo la fase S, unido a una disminución de p-ERK, CDK4, ciclina D3 y D1, y a un incremento de p21 y CDK2. Esta expresión alta de CDK2 explicaría por qué las células tumorales en AD ralentizarían el ciclo sin llegar a un estado de quiescencia total. La sobreexpresión de DUSP10 no detuvo las células en fase G0/G1 y correlacionó con un aumento de CDK6, CDK2 y una disminución de p21. Por el contrario, la AD en células DUSP10 silenciadas promueve una mayor quiescencia, aumentando la fase G0/G1. Esto se pudo relacionar con una menor expresión de CDK2, CDK6 y ciclina D3, y un aumento de p21. En fibroblastos se ha visto como la inhibición simultánea de p21 y p27 desbloquea la IPC, promoviendo la proliferación de las células en confluencia (Yang et al., 2008). Además, fibroblastos p38 $\alpha^{-/-}$ promueven una mayor densidad celular asociada a una menor acumulación de p27 (Faust et al., 2005). Además, se ha visto en células epiteliales en quiescencia como fuerzas mecánicas ocasionadas por el fuerte contacto celular y, señalizando por E-CDH, inducen la entrada rápida al ciclo celular favoreciendo la proliferación a través de la acumulación nuclear y actividad de YAP1 y β -catenina (Benham-Pyle et al., 2015). En consecuencia, la sobreexpresión de DUSP10 disminuye la quiescencia celular inducida por la AD y el silenciamiento de DUSP10 lo promueve, posiblemente ayudado por el papel proliferativo de YAP1 y la desfosforilación de p38.

La falta de suero en fibroblastos reduce la expresión de CDK4 y CDK2, ciclina D1, ciclina D3 y p27 (Dietrich et al., 1997). Otros autores vieron en células HCT116 y HT29 que el tratamiento con celecoxib, inhibiendo COX2, detiene las células en fase G0/G1 debido a un aumento de p21, p27 y p-JNK (Xiao et al., 2008). Nuestros resultados mostraron que la expresión de DUSP10 está relacionada con una mayor proliferación a las 48 h sin suero, debido a que las células fueron capaces de mantener activa la fase S del ciclo celular y una mayor síntesis de ADN, ligado a una mayor expresión de CDK2 y la regulación tardía de p21 y p27. Por el contrario, el silenciamiento de DUSP10 mantuvo la expresión de CDK2 y CDK4, y adelantó la expresión de p27, lo que podría explicar la menor proliferación de las líneas silenciadas en ausencia de suero y el aumento de fase G0/G1 encontrado a las primeras 48 h.

En conjunto, los resultados obtenidos del ciclo celular indicarían que CDK2 es la proteína de ciclo más claramente regulada por la acción de DUSP10. En condiciones basales, en ausencia de estrés alguno, la sobreexpresión de DUSP10 en la línea HT29 incrementa la expresión de CDK2 correlacionando con una mayor fase S y G2/M, y viceversa cuando se silencia la fosfatasa.

5. DUSP10 en la resistencia a los quimioterapéuticos.

A lo largo de los últimos años, los agentes quimioterapéuticos más comúnmente utilizados en el tratamiento del CCR han sido OxPt, CsPt y 5FU (Arnould et al., 2002; Chen et al., 2002). COX2 es considerada una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer debido a que promueve, en parte, la resistencia a los quimioterapéuticos en los tumores (Vosooghi and Amini, 2014). Nuestros resultados mostraron como la resistencia a la genotoxicidad a tiempos largos era mucho mayor si las células de CCR sobreexpresaban COX2, de modo similar a lo descrito en otras líneas tumorales que no son de CCR (Okamura et al., 2013; Takaoka et al., 2008) Tanto el CsPt, el OxPt como el 5FU inducen la activación de las rutas de señalización dependientes de JNK, p38 y ERK, todas ellas implicadas en las respuestas celulares al estrés (Brozovic and Osmak, 2007; Yang et al., 2011). Los daños en el ADN producidos por los quimioterapéuticos también inducen la expresión de DUSP10, afectando la proliferación y la apoptosis (Bar-Shira et al., 2002), como hemos confirmado con algunas drogas utilizadas. Aunque nuestros resultados mostraron una ligera menor sensibilidad al OxPt, CsPt y 5FU sobreexpresando DUSP10 y una mayor sensibilidad al silenciar el gen, estos datos no fueron ni mucho menos tan espectaculares como los obtenidos con la sobreexpresión de COX2, indicando que otros mediadores debajo de la acción de COX2 estarían también implicados. La resistencia a la citotoxicidad ocasionada por el GFT fue más clara y dependiente de la expresión de DUSP10, implicando probablemente tanto a YAP1 como a p38. Estos datos experimentales estarían de acuerdo con los análisis que hemos realizado por biología de sistemas, ya que a pesar de tener DUSP10 un efecto general sobre la resistencia a los quimioterapéuticos, su expresión fue importante únicamente con el trametinib, inhibidor de MEK. En consecuencia, es posible que el efecto de DUSP10 se observe sólo en aquellos casos en que el inhibidor afecte a la ruta de las MAPK.

Ha sido descrito que p53 potencia la respuesta al estrés genotóxico a través de JNK, debido a que compite por el sitio de unión con DUSP10. Cuando p53 se une a JNK la mantiene activa y promueve la apoptosis, mientras que la inactivación de JNK por la unión de DUSP10 promueve una menor apoptosis ante el estrés genotóxico (Gowda et al., 2012). En el tratamiento del cáncer, la actividad de p38 estaría relacionada con la activación de la vía MEK-ERK-ATF2 y el uso de terapia combinada, inhibiendo tanto p38 como ERK, se haría necesaria para promover la muerte celular (Chiacchiera et al., 2012; Rudalska et al., 2014). En diferentes líneas de CCR, la activación de p38 pero no de JNK promueve la muerte celular por OxPt a través de la desregulación de NF- κ B (Rakitina et al., 2003). De nuevo, vemos una discrepancia entre los efectos de inhibir la activación de p38 y la sobreexpresión

de DUSP10, que tendría un efecto teóricamente similar sobre p38. Ello podría deberse al efecto extra de DUSP10 sobre YAP1, que podría confundir los análisis. En lo que concierne a YAP1 se ha observado como su expresión genera resistencia a la muerte celular provocada por el tratamiento con 5FU del CCR, debido a que promueve la quiescencia en las células epiteliales intestinales (Touil et al., 2014). Además, la activación por EGFR activa la ruta Hippo inhibiendo YAP1 (Reddy and Irvine, 2013). Por lo tanto, el uso de inhibidores de EGFR favorecería la acumulación de dicha proteína en el núcleo, activando respuestas proliferativas y de supervivencia. El análisis mediante biología de sistemas apuntó a una asociación de YAP1 con la resistencia al 5FU, relacionándose con p38 pero no con DUSP10. En resumen, la mayor resistencia a algunos quimioterapéuticos podría ser explicada a través de la expresión conjunta o independiente de DUSP10, YAP y la regulación de la fosforilación de p38, capaces de interaccionar entre sí en el CCR.

6. Resumen.

En consecuencia, los resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis indican que DUSP10 es una nueva diana de la acción de COX2/PG y se induce por diversos estreses (osmótico, genotóxico, privación de suero) y estaría implicado en un nuevo mecanismo de regulación de la carcinogénesis a través de YAP1. Sin embargo, podemos afirmar que DUSP10 tiene un efecto complejo en el desarrollo del CCR, especialmente si se considera desde el inicio de la enfermedad una consecuencia de la inflamación crónica del intestino. En una primera fase, DUSP10 podría ser antiinflamatorio vía desfosforilación de p38 y, probablemente, inducido por COX1 y no por COX2. Posteriormente, los mayores niveles de PGE₂ y PGF_{2α}, sintetizados por COX2, activarían la expresión aún mayor de DUSP10 y, conjuntamente con la adquisición de otras mutaciones, darían a DUSP10 un papel pro-tumoral. Por un lado, DUSP10 estaría regulando negativamente a p38 y, de este modo, favoreciendo la proliferación de las células de CCR. Por otro lado, DUSP10 estaría estabilizando a YAP1 y, a la vez, desfosforilando a p38, favoreciendo de ambas maneras la constitutiva activación de YAP, la evasión de la inhibición por contacto y, probablemente, haciendo al tumor más resistente a la privación de factores de crecimiento celular. Al mismo tiempo, DUSP10 es inducido por varios estreses, siendo capaz de alterar el ciclo celular y, mediante la regulación de CDK2, favorecer la proliferación y el desarrollo tumoral. Por último, DUSP10 podría estar implicado en la resistencia a ciertas drogas, principalmente aquellas asociadas a la activación de las MAPK.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto por vez primera el papel pro-tumoral de DUSP10 en el CCR. Todo ello, haría de DUSP10 una posible diana terapéutica durante el proceso de carcinogénesis.

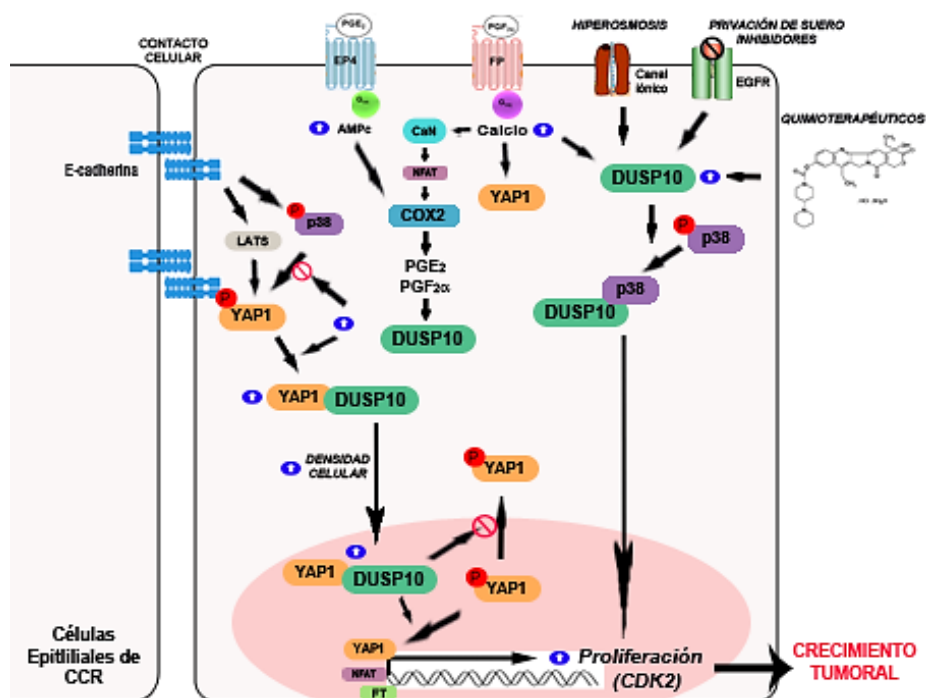


Figura D. Modelo de la implicación de DUSP10 en el CCR. La expresión de DUSP10 está inducida por la actividad de COX2 por la PGE₂ y PGE_{2α} que median su acción a través de EP4 y FP, respectivamente, señalizando por medio de los segundos mensajeros AMPc y Ca²⁺. DUSP10 también se induce por estreses como hiperosmosis, genotoxicidad y privación de suero. La alta densidad celular provoca una inducción de DUSP10 y YAP1, unida a una translocación en paralelo de ambas proteínas al núcleo de las células de CCR. DUSP10 a través de su translocación al núcleo, su asociación con YAP1 y la regulación negativa de p38 por desfosforilación, provoca una mayor proliferación in vitro, un mayor desarrollo tumoral in vivo y un peor pronóstico en pacientes de cáncer de colon. Todo ello debido a que estaría regulando la expresión de CDK2 y, con ello, la proliferación de las células epiteliales tumorales en el CCR.

CONCLUSIONES

1. DUSP10 es un gen inducido por la activación de la enzima COX2 a través de PGE₂ y PGF_{2α} y sus receptores EP4 y FP, respectivamente, mediante la movilización de Ca²⁺ y AMPc en células de adenocarcinoma colorrectal.
2. La actividad fosfatasa de DUSP10 regula selectivamente por desfosforilación a la proteína p38 MAPK, mientras que no lo hace sobre las proteínas ERK y JNK, en las líneas celulares de CCR.
3. DUSP10 influye en el fenotipo proliferativo *in vitro*, regulando la fase de síntesis de ADN del ciclo celular, y en el desarrollo tumoral *in vivo*, afectando a la velocidad de crecimiento tumoral de los xenoinjertos generados en ratones inmunodeprimidos.
4. DUSP10 confiere una ventaja proliferativa para evadir la inhibición de la proliferación por contacto de las células tumorales de CCR. La alta densidad induce la expresión de DUSP10 y YAP1 que interaccionan entre sí y con p38, al mismo tiempo que la translocación de YAP1 al núcleo es dependiente de DUSP10. La actividad de DUSP10 y YAP1 en el núcleo en células en alta densidad confiere una ventaja proliferativa.
5. Existe una correlación positiva entre la expresión de las proteínas COX2, DUSP10, YAP1 y la ausencia de p38 fosforilado en las muestras de colon de pacientes con CCR.
6. En pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales disminuye la expresión de DUSP10, asociándose con la expresión de COX1 en pacientes con colitis ulcerosa y con la expresión de COX2 en pacientes con enfermedad de Crohn. En los tumores de los ratones existe una alta expresión de DUSP10 y YAP1 en el citoplasma y en el núcleo de las células del epitelio tumoral.
7. El estrés genotóxico inducido por el tratamiento con quimioterapéuticos aumenta la expresión de DUSP10 en células de CCR. La alta expresión de COX2 confiere una mayor resistencia a la citotoxicidad provocada por el cisplatino, oxaliplatino y 5-fluorouracilo. Del mismo modo, la expresión de DUSP10 influye en la resistencia al gefitinib y parece estar ligada a la expresión de YAP1 y a la desfosforilación de p38.

8. El estrés osmótico induce la expresión de *DUSP10* que regula los niveles de fosforilación de p38. Dicho estrés elevada la expresión de los genes *PTGS1*, *MPGES-1*, *PGFS*, *NFATc1*, *p21* y *RCAN*, mientras que baja la de los genes *PTGS2*, *NFATc4* y *NFAT5*.
9. La privación de suero induce la expresión de *DUSP10* que regula negativamente a p38 y confiere una ventaja proliferativa a la línea celular ante dicho estrés. Al mismo tiempo, los niveles de expresión de la proteína activadora de ciclo CDK2 y las proteínas inhibidoras p21 y p27 dependen de la presencia de *DUSP10*, alterando la fase G0/G1 y S del ciclo celular.

BIBLIOGRAFÍA

Abercrombie, M. (1979). Contact inhibition and malignancy. Nature 281, 259-262.

Abraham, A.C., Castilho, R.M., Squarize, C.H., Molinolo, A.A., dos Santos-Pinto, D., Jr., and Gutkind, J.S. (2010). A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. Oral oncology 46, 880-887.

Alfran, A., Iniguez, M.A., Fresno, M., and Redondo, J.M. (2006). Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. Cardiovascular research 70, 446-456.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. Cell 117, 699-711.

Ambrosino, C., Mace, G., Galban, S., Fritsch, C., Vintersten, K., Black, E., Gorospe, M., and Nebreda, A.R. (2003). Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. Molecular and cellular biology 23, 370-381.

Arends, J.W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. The Journal of pathology 190, 412-416.

Arnould, S., Guichard, S., Hennebelle, I., Cassar, G., Bugat, R., and Canal, P. (2002). Contribution of apoptosis in the cytotoxicity of the oxaliplatin-irinotecan combination in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Biochemical pharmacology 64, 1215-1226.

Bae, J.S., Kim, S.M., and Lee, H. (2017). The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. Oncotarget 8, 16084-16098.

Bae, S.I., and Kim, Y.S. (2014). Colon cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. Clinical endoscopy 47, 509-515.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357, 539-545.

Bar-Shira, A., Rashi-Elkeles, S., Zlochover, L., Moyal, L., Smorodinsky, N.I., Seger, R., and Shiloh, Y. (2002). ATM-dependent activation of the gene encoding MAP kinase phosphatase 5 by radiomimetic DNA damage. Oncogene 21, 849-855.

Bargen, J.A. (1994). Chronic ulcerative colitis associated with malignant disease. 1928. Diseases of the colon and rectum 37, 727-730.

Barone, F.C., Irving, E.A., Ray, A.M., Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A.M., White, R.F., McVey, M.J., Legos, J.J., et al. (2001). SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 296, 312-321.

Barry, E.R., Morikawa, T., Butler, B.L., Shrestha, K., de la Rosa, R., Yan, K.S., Fuchs, C.S., Magness, S.T., Smits, R., Ogino, S., et al. (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. Nature 493, 106-110.

Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J. (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. Molecular cell 11, 11-23.

Belley, A., and Chadee, K. (1999). Prostaglandin E(2) stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP(4) receptor. Gastroenterology 117, 1352-1362.

Benavides-Serrato, A., Anderson, L., Holmes, B., Cloninger, C., Artinian, N., Bashir, T., and Gera, J. (2014). mTORC2 modulates feedback regulation of p38 MAPK activity via DUSP10/MKP5 to confer differential responses to PP242 in glioblastoma. Genes & cancer 5, 393-406.

Bene, L., Falus, A., Baffy, N., and Fulop, A.K. (2011). Cellular and molecular mechanisms in the two major forms of inflammatory bowel disease. Pathology oncology research : POR 17, 463-472.

Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Cell adhesion. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and beta-catenin activation to drive cell cycle entry. Science 348, 1024-1027.

Bermudez, O., Pages, G., and Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. American journal of physiology Cell physiology 299, C189-202.

Bhagat, S., and Das, K.M. (1994). A shared and unique peptide in the human colon, eye, and joint detected by a monoclonal antibody. Gastroenterology 107, 103-108.

Bos, C.L., Richel, D.J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P., and Versteeg, H.H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. The international journal of biochemistry & cell biology 36, 1187-1205.

Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., and Breyer, M.D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annual review of pharmacology and toxicology 41, 661-690.

Brocker, C., Thompson, D.C., and Vasiliou, V. (2012). The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. Biomolecular concepts 3, 345-364.

Brozovic, A., and Osmak, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. Cancer letters 251, 1-16.

Bunimov, N., Smith, J.E., Gosselin, D., and Laneuville, O. (2007). Translational regulation of PGHS-1 mRNA: 5' untranslated region and first two exons conferring negative regulation. Biochimica et biophysica acta 1769, 92-105.

Buzzi, N., Colicheo, A., Boland, R., and de Boland, A.R. (2009). MAP kinases in proliferating human colon cancer Caco-2 cells. Molecular and cellular biochemistry 328, 201-208.

Cai, J., Maitra, A., Anders, R.A., Taketo, M.M., and Pan, D. (2015). beta-Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis. Genes & development 29, 1493-1506.

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R.F., Maitra, A., and Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. Genes & development 24, 2383-2388.

Camps, M., Nichols, A., and Arkinstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 14, 6-16.

Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 487, 330-337.

Candido, J., and Hagemann, T. (2013). Cancer-related inflammation. Journal of clinical immunology 33 Suppl 1, S79-84.

Casanovas, O., Miro, F., Estanyol, J.M., Itarte, E., Agell, N., and Bachs, O. (2000). Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. The Journal of biological chemistry 275, 35091-35097.

Cassano, G., Gasparre, G., Susca, F., Lippe, C., and Guanti, G. (2000). Effect of prostaglandin E(2) on the proliferation, Ca(2+) mobilization and cAMP in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Cancer letters 152, 217-222.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., *et al.* (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer discovery 2, 401-404.

Collins, D., Hogan, A.M., Skelly, M.M., Baird, A.W., and Winter, D.C. (2009). Cyclic AMP-mediated chloride secretion is induced by prostaglandin F2alpha in human isolated colon. British journal of pharmacology 158, 1771-1776.

Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, F.C., Bagnulo, R., Ingravallo, G., Modica, S., Lo Sasso, G., Moschetta, A., *et al.* (2007). A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. Cell death and differentiation 14, 693-702.

Corral, R.S., Iniguez, M.A., Duque, J., Lopez-Perez, R., and Fresno, M. (2007). Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells. Oncogene 26, 958-969.

Coruzzi, G., Venturi, N., and Spaggiari, S. (2007). Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. Acta bio-medica : Atenei Parmensis 78, 96-110.

Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. Biochimica et biophysica acta 1773, 1376-1387.

Cox, D.G., Pontes, C., Guino, E., Navarro, M., Osorio, A., Canzian, F., Moreno, V., and Bellvitge Colorectal Cancer Study, G. (2004). Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. British journal of cancer 91, 339-343.

Crew, T.E., Elder, D.J., and Paraskeva, C. (2000). A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. Carcinogenesis 21, 69-77.

Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochimica et biophysica acta 1773, 1358-1375.

Chan, A.T., Ogino, S., and Fuchs, C.S. (2007). Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. The New England journal of medicine 356, 2131-2142.

Chan, E.H., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R.B., Schafer, A., Nigg, E.A., and Sillje, H.H. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. Oncogene 24, 2076-2086.

Chang, J., Vacher, J., Yao, B., Fan, X., Zhang, B., Harris, R.C., and Zhang, M.Z. (2015). Prostaglandin E receptor 4 (EP4) promotes colonic tumorigenesis. Oncotarget 6, 33500-33511.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410, 37-40.

Chen, D., Fong, H.W., and Davis, J.S. (2001a). Induction of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acid expression by prostaglandin F2alpha is mediated by a protein kinase C-dependent extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway in bovine luteal cells. Endocrinology 142, 887-895.

Chen, X.X., Lai, M.D., Zhang, Y.L., and Huang, Q. (2002). Less cytotoxicity to combination therapy of 5-fluorouracil and cisplatin than 5-fluorouracil alone in human colon cancer cell lines. World journal of gastroenterology : WJG 8, 841-846.

Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. (2001b). MAP kinases. Chemical reviews 101, 2449-2476.

Cheng, H.F., Wang, J.L., Zhang, M.Z., McKanna, J.A., and Harris, R.C. (2000). Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. The Journal of clinical investigation 106, 681-688.

Cheng, Q., Zhang, Q., Xu, X., Yin, L., Sun, L., Lin, X., Dong, C., and Pan, W. (2014). MAPK phosphatase 5 deficiency contributes to protection against blood-stage Plasmodium yoelii 17XL infection in mice. Journal of immunology 192, 3686-3696.

Chiacchiera, F., Grossi, V., Cappellari, M., Peserico, A., Simonatto, M., Germani, A., Russo, S., Moyer, M.P., Resta, N., Murzilli, S., et al. (2012). Blocking p38/ERK crosstalk affects colorectal cancer growth by inducing apoptosis in vitro and in preclinical mouse models. Cancer letters 324, 98-108.

Choi, H.R., Kim, W.K., Kim, E.Y., Han, B.S., Min, J.K., Chi, S.W., Park, S.G., Bae, K.H., and Lee, S.C. (2013). Dual-specificity phosphatase 10 controls brown adipocyte differentiation by modulating the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase. PLoS one 8, e72340.

Daniel, C., Gerlach, K., Vath, M., Neurath, M.F., and Weigmann, B. (2014). Nuclear factor of activated T cells - a transcription factor family as critical regulator in lung and colon cancer. International journal of cancer Journal international du cancer 134, 1767-1775.

Danovi, S.A., Rossi, M., Gudmundsdottir, K., Yuan, M., Melino, G., and Basu, S. (2008). Yes-associated protein (YAP) is a critical mediator of c-Jun-dependent apoptosis. Cell death and differentiation 15, 217-219.

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., Bringer, M.A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. Gastroenterology 127, 412-421.

Das Thakur, M., and Stuart, D.D. (2014). Molecular pathways: response and resistance to BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) tumors. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 20, 1074-1080.

Del Reino, P., Alsina-Beauchamp, D., Escos, A., Cerezo-Guisado, M.I., Risco, A., Aparicio, N., Zur, R., Fernandez-Estevez, M., Collantes, E., Montans, J., *et al.* (2014). Pro-oncogenic role of alternative p38 mitogen-activated protein kinases p38gamma and p38delta, linking inflammation and cancer in colitis-associated colon cancer. Cancer research 74, 6150-6160.

Diaz-Flores, E., Goldschmidt, H., Depeille, P., Ng, V., Akutagawa, J., Krisman, K., Crone, M., Burgess, M.R., Williams, O., Houseman, B., *et al.* (2013). PLC-gamma and PI3K link cytokines to ERK activation in hematopoietic cells with normal and oncogenic Kras. Science signaling 6, ra105.

Diaz-Munoz, M.D., Osma-Garcia, I.C., Fresno, M., and Iniguez, M.A. (2012). Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. The Biochemical journal 443, 451-461.

Dickinson, R.J., and Keyse, S.M. (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. Journal of cell science 119, 4607-4615.

Dietrich, C., Wallenfang, K., Oesch, F., and Wieser, R. (1997). Differences in the mechanisms of growth control in contact-inhibited and serum-deprived human fibroblasts. Oncogene 15, 2743-2747.

Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. Cell 130, 1120-1133.

Duan, X., Gao, Y., Yang, H., Feng, T., Jin, T., Long, Y., and Chen, C. (2015). Polymorphisms in the DUSP10 gene are associated with sex-specific colorectal cancer risk in a Han population. International journal of clinical and experimental pathology 8, 2018-2025.

Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *12*, 1063-1073.

Duque, J., Fresno, M., and Iniguez, M.A. (2005). Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* *280*, 8686-8693.

Eagle, H., and Levine, E.M. (1967). Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature* *213*, 1102-1106.

Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., and DuBois, R.N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* *107*, 1183-1188.

Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science* *118*, 2997-3002.

Eccles, S.A., Box, G., Court, W., Sandle, J., and Dean, C.J. (1994). Preclinical models for the evaluation of targeted therapies of metastatic disease. *Cell biophysics* *24-25*, 279-291.

Ehmer, U., and Sage, J. (2016). Control of Proliferation and Cancer Growth by the Hippo Signaling Pathway. *Molecular cancer research : MCR* *14*, 127-140.

Faust, D., Dolado, I., Cuadrado, A., Oesch, F., Weiss, C., Nebreda, A.R., and Dietrich, C. (2005). p38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene* *24*, 7941-7945.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759-767.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer* *136*, E359-386.

Fernandez de Larrea-Baz, N., Alvarez-Martin, E., Morant-Ginestar, C., Genova-Maleras, R., Gil, A., Perez-Gomez, B., and Lopez-Abente, G. (2009). Burden of disease due to cancer in Spain. *BMC public health* *9*, 42.

Finch, A.R., Caunt, C.J., Perrett, R.M., Tsaneva-Atanasova, K., and McArdle, C.A. (2012). Dual specificity phosphatases 10 and 16 are positive regulators of EGF-stimulated ERK activity: indirect regulation of ERK signals by JNK/p38 selective MAPK phosphatases. *Cellular signalling* *24*, 1002-1011.

FitzGerald, G.A., and Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England journal of medicine* *345*, 433-442.

Flossmann, E., and Rothwell, P.M. (2007). Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *The Lancet* *369*, 1603-1613.

Fracchia, K.M., Pai, C.Y., and Walsh, C.M. (2013). Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. Frontiers in immunology 4, 324.

Frolkis, A., Dieleman, L.A., Barkema, H.W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R.N., Madsen, K., Kaplan, G.G., and Alberta, I.B.D.C. (2013). Environment and the inflammatory bowel diseases. Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie 27, e18-24.

Fujino, H., and Regan, J.W. (2003). Prostaglandin F(2alpha) stimulation of cyclooxygenase-2 promoter activity by the FP(B) prostanoid receptor. European journal of pharmacology 465, 39-41.

Fujino, H., Srinivasan, D., Pierce, K.L., and Regan, J.W. (2000). Differential regulation of prostaglandin F(2alpha) receptor isoforms by protein kinase C. Molecular pharmacology 57, 353-358.

Gallicchio, M., Rosa, A.C., Dianzani, C., Brucato, L., Benetti, E., Collino, M., and Fantozzi, R. (2008). Celecoxib decreases expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in a colon cancer cell line (HT29). British journal of pharmacology 153, 870-878.

Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., *et al.* (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Science signaling 6, p11.

Garavito, R.M., Malkowski, M.G., and DeWitt, D.L. (2002). The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Prostaglandins & other lipid mediators 68-69, 129-152.

Gauthier, M.L., Pickering, C.R., Miller, C.J., Fordyce, C.A., Chew, K.L., Berman, H.K., and Tlsty, T.D. (2005). p38 regulates cyclooxygenase-2 in human mammary epithelial cells and is activated in premalignant tissue. Cancer research 65, 1792-1799.

Giardiello, F.M., Offerhaus, J.A., Tersmette, A.C., Hylind, L.M., Krush, A.J., Brensinger, J.D., Booker, S.V., and Hamilton, S.R. (1996). Sulindac induced regression of colorectal adenomas in familial adenomatous polyposis: evaluation of predictive factors. Gut 38, 578-581.

Gowda, P.S., Zhou, F., Chadwell, L.V., and McEwen, D.G. (2012). p53 binding prevents phosphatase-mediated inactivation of diphosphorylated c-Jun N-terminal kinase. The Journal of biological chemistry 287, 17554-17567.

Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. Carcinogenesis 30, 377-386.

Gregorieff, A., Liu, Y., Inanlou, M.R., Khomchuk, Y., and Wrana, J.L. (2015). Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer. Nature 526, 715-718.

Guerrant, W., Kota, S., Troutman, S., Mandati, V., Fallahi, M., Stemmer-Rachamimov, A., and Kissil, J.L. (2016). YAP Mediates Tumorigenesis in Neurofibromatosis Type 2 by Promoting Cell Survival and Proliferation through a COX-2-EGFR Signaling Axis. Cancer research 76, 3507-3519.

Gupta, J., del Barco Barrantes, I., Igea, A., Sakellariou, S., Pateras, I.S., Gorgoulis, V.G., and Nebreda, A.R. (2014). Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. Cancer cell 25, 484-500.

Gustafsson, A., Hansson, E., Kressner, U., Nordgren, S., Andersson, M., Lonnroth, C., and Lundholm, K. (2007). Prostanoid receptor expression in colorectal cancer related to tumor stage, differentiation and progression. Acta oncologica 46, 1107-1112.

Hamasaki, Y., Kitzler, J., Hardman, R., Nettesheim, P., and Eling, T.E. (1993). Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. Archives of biochemistry and biophysics 304, 226-234.

Han, J., and Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. Trends in biochemical sciences 32, 364-371.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-674.

Hara, S., Arai, M., Tomaru, K., Doi, H., Koitabashi, N., Iso, T., Watanabe, A., Tanaka, T., Maeno, T., Suga, T., et al. (2008). Prostaglandin F $_{2\alpha}$ inhibits SERCA2 gene transcription through an induction of Egr-1 in cultured neonatal rat cardiac myocytes. International heart journal 49, 329-342.

Hardwick, J.C., van den Brink, G.R., Offerhaus, G.J., van Deventer, S.J., and Peppelenbosch, M.P. (2001). NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. Oncogene 20, 819-827.

Harris, R.E., Beebe, J., and Alshafie, G.A. (2012). Reduction in cancer risk by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. Journal of experimental pharmacology 4, 91-96.

Hawcroft, G., Ko, C.W., and Hull, M.A. (2007). Prostaglandin E $_2$ -EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. Oncogene 26, 3006-3019.

Hawkey, C.J. (1996). Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy: causes and treatment. Scandinavian journal of gastroenterology Supplement 220, 124-127.

He, G., Zhang, L., Li, Q., and Yang, L. (2014). miR-92a/DUSP10/JNK signalling axis promotes human pancreatic cancer cells proliferation. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 68, 25-30.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Burgel, N., Fromm, M., et al. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. Gastroenterology 129, 550-564.

Hoang, V.T., Yan, T.J., Cavanaugh, J.E., Flaherty, P.T., Beckman, B.S., and Burow, M.E. (2017). Oncogenic signaling of MEK5-ERK5. Cancer letters 392, 51-59.

Holbrook, N.J., and Fornace, A.J., Jr. (1991). Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. The New biologist 3, 825-833.

Horsley, V., and Pavlath, G.K. (2003). Prostaglandin F₂(α) stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. The Journal of cell biology *161*, 111-118.

Hrstka, R., Bouchalova, P., Michalova, E., Matoulikova, E., Muller, P., Coates, P.J., and Vojtesek, B. (2015). AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway. Molecular oncology.

Hsi, L.C., Angerman-Stewart, J., and Eling, T.E. (1999). Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. Carcinogenesis *20*, 2045-2049.

Hu, X., Xin, Y., Xiao, Y., and Zhao, J. (2014). Overexpression of YAP1 is correlated with progression, metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. Pathology oncology research : POR *20*, 805-811.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. Cell *122*, 421-434.

Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E., and Wagner, E.F. (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. The Journal of clinical investigation *118*, 3943-3953.

Imai, K., and Yamamoto, H. (2008). Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. Carcinogenesis *29*, 673-680.

Iniguez, M.A., Cacheiro-Llaguno, C., Cuesta, N., Diaz-Munoz, M.D., and Fresno, M. (2008). Prostanoid function and cardiovascular disease. Archives of physiology and biochemistry *114*, 201-209.

Iniguez, M.A., Rodriguez, A., Volpert, O.V., Fresno, M., and Redondo, J.M. (2003). Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. Trends in molecular medicine *9*, 73-78.

Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 7220-7225.

James, S.J., Jiao, H., Teh, H.Y., Takahashi, H., Png, C.W., Phoon, M.C., Suzuki, Y., Sawasaki, T., Xiao, H., Chow, V.T., et al. (2015). MAPK Phosphatase 5 Expression Induced by Influenza and Other RNA Virus Infection Negatively Regulates IRF3 Activation and Type I Interferon Response. Cell reports.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians *61*, 69-90.

Jess, T., Rungoe, C., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association *10*, 639-645.

Johnson, M.D., Reeder, J.E., and O'Connell, M. (2016). p38MAPK activation and DUSP10 expression in meningiomas. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia 30, 110-114.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature 491, 119-124.

Kabir, N.N., Ronnstrand, L., and Kazi, J.U. (2013). Deregulation of protein phosphatase expression in acute myeloid leukemia. Medical oncology 30, 517.

Kaiser, S., Park, Y.K., Franklin, J.L., Halberg, R.B., Yu, M., Jessen, W.J., Freudenberg, J., Chen, X., Haigis, K., Jegga, A.G., et al. (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. Genome biology 8, R131.

Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., et al. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. The EMBO journal 19, 6778-6791.

Kang, W., Tong, J.H., Chan, A.W., Lee, T.L., Lung, R.W., Leung, P.P., So, K.K., Wu, K., Fan, D., Yu, J., et al. (2011). Yes-associated protein 1 exhibits oncogenic property in gastric cancer and its nuclear accumulation associates with poor prognosis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 17, 2130-2139.

Kapoor, A., Yao, W., Ying, H., Hua, S., Liewen, A., Wang, Q., Zhong, Y., Wu, C.J., Sadanandam, A., Hu, B., et al. (2014). Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. Cell 158, 185-197.

Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J., Riendeau, D., Mancini, J., Evans, J., and O'Neill, G. (1996). Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. Gastroenterology 111, 445-454.

Kaser, A., Niederreiter, L., and Blumberg, R.S. (2011). Genetically determined epithelial dysfunction and its consequences for microflora-host interactions. Cellular and molecular life sciences : CMLS 68, 3643-3649.

Kawamori, T., Rao, C.V., Seibert, K., and Reddy, B.S. (1998). Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer research 58, 409-412.

Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2003). Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. Carcinogenesis 24, 985-990.

Keyse, S.M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. Current opinion in cell biology 12, 186-192.

Khammanit, R., Chantakru, S., Kitiyanant, Y., and Saikhun, J. (2008). Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. Theriogenology 70, 27-34.

Kikuchi, Y., Dinjens, W.N., and Bosman, F.T. (1997). Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. Virchows Archiv : an international journal of pathology 431, 111-117.

Kim, H.B., Kim, M., Park, Y.S., Park, I., Kim, T., Yang, S.Y., Cho, C.J., Hwang, D., Jung, J.H., Markowitz, S.D., et al. (2017). Prostaglandin E2 Activates YAP and a Positive-Signaling Loop to Promote Colon Regeneration After Colitis but Also Carcinogenesis in Mice. Gastroenterology 152, 616-630.

Kim, N.G., Koh, E., Chen, X., and Gumbiner, B.M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 11930-11935.

Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K., Woodward, D.F., and Takusagawa, F. (2006). Prostaglandin F2alpha formation from prostaglandin H2 by prostaglandin F synthase (PGFS): crystal structure of PGFS containing bimatoprost. Biochemistry 45, 1987-1996.

Koukoui, O., Boucherie, S., Sezan, A., Prigent, S., and Combettes, L. (2006). Effects of the prostaglandins PGF2alpha and PGE2 on calcium signaling in rat hepatocyte doublets. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 290, G66-73.

Kultz, D., Madhany, S., and Burg, M.B. (1998). Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. The Journal of biological chemistry 273, 13645-13651.

Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. Physiological reviews 92, 689-737.

Lake, S., Gullberg, H., Wahlqvist, J., Sjogren, A.M., Kinhult, A., Lind, P., Hellstrom-Lindahl, E., and Stjernschantz, J. (1994). Cloning of the rat and human prostaglandin F2 alpha receptors and the expression of the rat prostaglandin F2 alpha receptor. FEBS letters 355, 317-325.

Lakshmikuttyamma, A., Selvakumar, P., Kanthan, R., Kanthan, S.C., and Sharma, R.K. (2005). Increased expression of calcineurin in human colorectal adenocarcinomas. Journal of cellular biochemistry 95, 731-739.

Lawrence, M.C., Jivan, A., Shao, C., Duan, L., Goad, D., Zaganjor, E., Osborne, J., McGlynn, K., Stippec, S., Earnest, S., et al. (2008). The roles of MAPKs in disease. Cell research 18, 436-442.

Lei, Q.Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.Y., Bai, F., Pei, X.H., Zhao, S., Xiong, Y., and Guan, K.L. (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. Molecular and cellular biology 28, 2426-2436.

Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., and Shaul, Y. (2008). Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage. Molecular cell 29, 350-361.

Li, S., Gerrard, E.R., Jr., and Balkovetz, D.F. (2004). Evidence for ERK1/2 phosphorylation controlling contact inhibition of proliferation in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. American journal of physiology Cell physiology 287, C432-439.

Liao, X., Lochhead, P., Nishihara, R., Morikawa, T., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Imamura, Y., Qian, Z.R., Baba, Y., Shima, K., *et al.* (2012). Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. The New England journal of medicine 367, 1596-1606.

Loffler, I., Grun, M., Bohmer, F.D., and Rubio, I. (2008). Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. BMC cancer 8, 380.

Loftus, E.V., Jr. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 126, 1504-1517.

Low, B.C., Pan, C.Q., Shivashankar, G.V., Bershadsky, A., Sudol, M., and Sheetz, M. (2014). YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. FEBS letters 588, 2663-2670.

Luo, L.J., Liu, F., Wang, X.Y., Dai, T.Y., Dai, Y.L., Dong, C., and Ge, B.X. (2012). An essential function for MKP5 in the formation of oxidized low density lipid-induced foam cells. Cellular signalling 24, 1889-1898.

Ma, S.Q., Cao, B.R., Zhang, H., Luo, L.P., Ren, Y., Hu, T., and Chen, C.M. (2017). The lack of Raf-1 kinase feedback regulation enhances antiapoptosis in cancer cells. Oncogene 36, 2014-2022.

MacLachlan, T.K., Sang, N., and Giordano, A. (1995). Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. Critical reviews in eukaryotic gene expression 5, 127-156.

Mancini, M., and Toker, A. (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. Nature reviews Cancer 9, 810-820.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. Nature 454, 436-444.

Marshall, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. Current opinion in genetics & development 4, 82-89.

Milne, S.A., and Jabbour, H.N. (2003). Prostaglandin (PG) F(2alpha) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2alpha) in epithelial cell proliferation. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88, 1825-1832.

Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., *et al.* (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 142, 46-54 e42; quiz e30.

Moller, F.T., Andersen, V., Wohlfahrt, J., and Jess, T. (2015). Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. The American journal of gastroenterology 110, 564-571.

Moran, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernandez-Marcelo, T., Frias, C., Sanchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Diaz-Rubio, E., Iniesta, P., and Benito, M. (2010). Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. World journal of gastrointestinal oncology 2, 151-158.

Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. The Journal of biological chemistry 270, 10902-10908.

Nan, H., Hutter, C.M., Lin, Y., Jacobs, E.J., Ulrich, C.M., White, E., Baron, J.A., Berndt, S.I., Brenner, H., Butterbach, K., et al. (2015). Association of aspirin and NSAID use with risk of colorectal cancer according to genetic variants. Jama 313, 1133-1142.

Nikolaev, S.I., Rimoldi, D., Iseli, C., Valsesia, A., Robyr, D., Gehrig, C., Harshman, K., Guipponi, M., Bukach, O., Zoete, V., et al. (2011). Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. Nature genetics 44, 133-139.

Noble, C.L., Abbas, A.R., Cornelius, J., Lees, C.W., Ho, G.T., Toy, K., Modrusan, Z., Pal, N., Zhong, F., Chalasani, S., et al. (2008). Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. Gut 57, 1398-1405.

Nomura, M., Shiiba, K., Katagiri, C., Kasugai, I., Masuda, K., Sato, I., Sato, M., Kakugawa, Y., Nomura, E., Hayashi, K., et al. (2012). Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase of stress-activated kinases, on ERK-dependent gene expression, and upregulation of its gene expression in colon carcinomas. Oncology reports 28, 931-936.

Nugent, K.P., Spigelman, A.D., and Phillips, R.K. (1996). Tissue prostaglandin levels in familial adenomatous polyposis patients treated with sulindac. Diseases of the colon and rectum 39, 659-662.

Obrand, D.I., and Gordon, P.H. (1997). Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma. Diseases of the colon and rectum 40, 15-24.

Okamura, H., Fujiwara, H., Umehara, S., Okamura, S., Todo, M., Furutani, A., Yoneda, M., Shiozaki, A., Komatsu, S., Kubota, T., et al. (2013). COX-2 overexpression Induced by gene transfer reduces sensitivity of TE13 esophageal carcinoma cells to 5-fluorouracil and cisplatin. Anticancer research 33, 537-542.

Okayasu, I., Ohkusa, T., Kajiura, K., Kanno, J., and Sakamoto, S. (1996). Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. Gut 39, 87-92.

Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 87, 803-809.

Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. Oncogene 26, 3203-3213.

Palmer, H.G., Gonzalez-Sancho, J.M., Espada, J., Berciano, M.T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., de Herreros, A.G., Lafarga, M., et al. (2001). Vitamin D(3) promotes the differentiation of

colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. The Journal of cell biology 154, 369-387.

Park, J., Oh, Y., and Chung, K.C. (2009). Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1. BMB reports 42, 6-15.

Patterson, Kate I., Brummer, T., O'Brien, Philippa M., and Daly, Roger J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. Biochemical Journal 418, 475-489.

Pereira, L., Igea, A., Canovas, B., Dolado, I., and Nebreda, A.R. (2013). Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. EMBO molecular medicine 5, 1759-1774.

Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. Physiological reviews 94, 1287-1312.

Png, C.W., Weerasooriya, M., Guo, J., James, S.J., Poh, H.M., Osato, M., Flavell, R.A., Dong, C., Yang, H., and Zhang, Y. (2016). DUSP10 regulates intestinal epithelial cell growth and colorectal tumorigenesis. Oncogene 35, 206-217.

Poczobutt, J.M., Gijon, M., Amin, J., Hanson, D., Li, H., Walker, D., Weiser-Evans, M., Lu, X., Murphy, R.C., and Nemenoff, R.A. (2013). Eicosanoid profiling in an orthotopic model of lung cancer progression by mass spectrometry demonstrates selective production of leukotrienes by inflammatory cells of the microenvironment. PloS one 8, e79633.

Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., and Nebreda, A.R. (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. Molecular biology of the cell 15, 922-933.

Praskova, M., Xia, F., and Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. Current biology : CB 18, 311-321.

Qian, F., Deng, J., Cheng, N., Welch, E.J., Zhang, Y., Malik, A.B., Flavell, R.A., Dong, C., and Ye, R.D. (2009). A non-redundant role for MKP5 in limiting ROS production and preventing LPS-induced vascular injury. The EMBO journal 28, 2896-2907.

Qian, F., Deng, J., Gantner, B.N., Flavell, R.A., Dong, C., Christman, J.W., and Ye, R.D. (2012). Map kinase phosphatase 5 protects against sepsis-induced acute lung injury. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 302, L866-874.

Qualtrough, D., Kaidi, A., Chell, S., Jabbour, H.N., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Prostaglandin F(2alpha) stimulates motility and invasion in colorectal tumor cells. International journal of cancer Journal international du cancer 121, 734-740.

Rakitina, T.V., Vasilevskaya, I.A., and O'Dwyer, P.J. (2003). Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor kappaB signaling. Cancer research 63, 8600-8605.

Reddy, B.S., Rao, C.V., Rivenson, A., and Kelloff, G. (1993). Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Carcinogenesis 14, 1493-1497.

Reddy, B.V., and Irvine, K.D. (2013). Regulation of Hippo signaling by EGFR-MAPK signaling through Ajuba family proteins. Developmental cell 24, 459-471.

Regan, J.W. (2003). EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. Life sciences 74, 143-153.

Reimers, M.S., Bastiaannet, E., Langley, R.E., van Eijk, R., van Vlierberghe, R.L., Lemmens, V.E., van Herk-Sukel, M.P., van Wezel, T., Fodde, R., Kuppen, P.J., et al. (2014). Expression of HLA class I antigen, aspirin use, and survival after a diagnosis of colon cancer. JAMA internal medicine 174, 732-739.

Ren, F., Zhang, L., and Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. Developmental biology 337, 303-312.

Rhee, S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. Annual review of biochemistry 70, 281-312.

Rincon, M., and Davis, R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. Immunological reviews 228, 212-224.

Rizzo, M.T. (2011). Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 412, 671-687.

Roberts, H.R., Smartt, H.J., Greenhough, A., Moore, A.E., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2011). Colon tumour cells increase PGE(2) by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation. Carcinogenesis 32, 1741-1747.

Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., et al. (2012). beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. Cell 151, 1457-1473.

Rudalska, R., Dauch, D., Longerich, T., McJunkin, K., Wuestefeld, T., Kang, T.W., Hohmeyer, A., Pesic, M., Leibold, J., von Thun, A., et al. (2014). In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. Nature medicine 20, 1138-1146.

Sanchez, M.J., Payer, T., De Angelis, R., Larranaga, N., Capocaccia, R., Martinez, C., and Group, C.W. (2010). Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 21 Suppl 3, iii30-36.

Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annual review of cell and developmental biology 20, 695-723.

Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., and Hla, T. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer research 55, 3785-3789.

Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., *et al.* (2011). Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. Cell 144, 782-795.

Sebolt-Leopold, J.S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. Nature reviews Cancer 4, 937-947.

Shafer, L.M., and Slice, L.W. (2005). Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38(MAPK) and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. Biochimica et biophysica acta 1745, 393-400.

Shao, D.D., Xue, W., Krall, E.B., Bhutkar, A., Piccioni, F., Wang, X., Schinzel, A.C., Sood, S., Rosenbluh, J., Kim, J.W., *et al.* (2014). KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. Cell 158, 171-184.

Shao, J., Sheng, H., Inoue, H., Morrow, J.D., and DuBois, R.N. (2000). Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. The Journal of biological chemistry 275, 33951-33956.

Shi, H., Verma, M., Zhang, L., Dong, C., Flavell, R.A., and Bennett, A.M. (2013). Improved regenerative myogenesis and muscular dystrophy in mice lacking Mkp5. The Journal of clinical investigation 123, 2064-2077.

Shiff, S.J., Qiao, L., Tsai, L.L., and Rigas, B. (1995). Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. The Journal of clinical investigation 96, 491-503.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians 63, 11-30.

Smeeton, J., Zhang, X., Bulus, N., Mernaugh, G., Lange, A., Karner, C.M., Carroll, T.J., Fassler, R., Pozzi, A., Rosenblum, N.D., *et al.* (2010). Integrin-linked kinase regulates p38 MAPK-dependent cell cycle arrest in ureteric bud development. Development 137, 3233-3243.

Smith, W.L., and Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Advances in immunology 62, 167-215.

Song, M.K., Park, Y.K., and Ryu, J.C. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK. Toxicology and applied pharmacology 273, 130-139.

Sreeramkumar, V., Fresno, M., and Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? Immunology and cell biology 90, 579-586.

Stamatakis, K., Jimenez-Martinez, M., Jimenez-Segovia, A., Chico-Calero, I., Conde, E., Galan-Martinez, J., Ruiz, J., Pascual, A., Barrocal, B., Lopez-Perez, R., *et al.* (2015). Prostaglandins induce

early growth response 1 transcription factor mediated microsomal prostaglandin E2 synthase up-regulation for colorectal cancer progression. Oncotarget 6, 39941-39959.

Steinhardt, A.A., Gayyed, M.F., Klein, A.P., Dong, J., Maitra, A., Pan, D., Montgomery, E.A., and Anders, R.A. (2008). Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. Human pathology 39, 1582-1589.

Suarez-Cuervo, C., Merrell, M.A., Watson, L., Harris, K.W., Rosenthal, E.L., Vaananen, H.K., and Selander, K.S. (2004). Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. Clinical & experimental metastasis 21, 525-533.

Sudol, M. (1994). Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. Oncogene 9, 2145-2152.

Takafuji, V., Cosme, R., Lublin, D., Lynch, K., and Roche, J.K. (2000). Prostanoid receptors in intestinal epithelium: selective expression, function, and change with inflammation. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 63, 223-235.

Takahashi, F., and Das, K.M. (1985). Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. The Journal of clinical investigation 76, 311-318.

Takaoka, K., Kishimoto, H., Segawa, E., Otsu, N., Zushi, Y., Hashitani, S., Noguchi, K., and Urade, M. (2008). In vitro susceptibility to anticancer agents of the human KB carcinoma cell line transfected with COX-2 cDNA. Oncology reports 20, 645-649.

Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. The Journal of biological chemistry 275, 32775-32782.

Tanoue, T., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. The Journal of biological chemistry 274, 19949-19956.

Tao, X., and Tong, L. (2007). Crystal structure of the MAP kinase binding domain and the catalytic domain of human MKP5. Protein science : a publication of the Protein Society 16, 880-886.

Taxman, D.J., Holley-Guthrie, E.A., Huang, M.T., Moore, C.B., Bergstralh, D.T., Allen, I.C., Lei, Y., Gris, D., and Ting, J.P. (2011). The NLR adaptor ASC/PYCARD regulates DUSP10, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and chemokine induction independent of the inflammasome. The Journal of biological chemistry 286, 19605-19616.

Theodosiou, A., and Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. Genome biology 3, REVIEWS3009.

Theodosiou, A., Smith, A., Gillieron, C., Arkinstall, S., and Ashworth, A. (1999). MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. Oncogene 18, 6981-6988.

Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. International journal of biological sciences 5, 44-51.

Thun, M.J., Namboodiri, M.M., and Heath, C.W., Jr. (1991). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. The New England journal of medicine 325, 1593-1596.

Touil, Y., Igoudjil, W., Corvaisier, M., Dessein, A.F., Vandomme, J., Monte, D., Stechly, L., Skrypek, N., Langlois, C., Grard, G., et al. (2014). Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 20, 837-846.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. Current opinion in cell biology 8, 205-215.

Urosevic, J., Garcia-Albeniz, X., Planet, E., Real, S., Cespedes, M.V., Guiu, M., Fernandez, E., Bellmunt, A., Gawrzak, S., Pavlovic, M., et al. (2014). Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. Nature cell biology 16, 685-694.

Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., and DePamphilis, M.L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. Genes & development 15, 1229-1241.

Ventura, J.J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J. (2006). Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. Molecular cell 21, 701-710.

Vila-del Sol, V., and Fresno, M. (2005). Involvement of TNF and NF-kappa B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages. Journal of immunology 174, 2825-2833.

Vlahov, N., Scrace, S., Soto, M.S., Grawenda, A.M., Bradley, L., Pankova, D., Papaspyropoulos, A., Yee, K.S., Buffa, F., Goding, C.R., et al. (2015). Alternate RASSF1 Transcripts Control SRC Activity, E-Cadherin Contacts, and YAP-Mediated Invasion. Current biology : CB 25, 3019-3034.

von Roon, A.C., Reese, G., Teare, J., Constantinides, V., Darzi, A.W., and Tekkis, P.P. (2007). The risk of cancer in patients with Crohn's disease. Diseases of the colon and rectum 50, 839-855.

Vosooghi, M., and Amini, M. (2014). The discovery and development of cyclooxygenase-2 inhibitors as potential anticancer therapies. Expert opinion on drug discovery 9, 255-267.

Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. Development 138, 3907-3914.

Wada, T., and Penninger, J.M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 23, 2838-2849.

Wakeman, D., Schneider, J.E., Liu, J., Wandu, W.S., Erwin, C.R., Guo, J., Stappenbeck, T.S., and Warner, B.W. (2012). Deletion of p38-alpha mitogen-activated protein kinase within the intestinal epithelium promotes colon tumorigenesis. Surgery 152, 286-293.

Wang, C., Zhu, X., Feng, W., Yu, Y., Jeong, K., Guo, W., Lu, Y., and Mills, G.B. (2016). Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3sigma sequestering YAP in the cytoplasm. American journal of cancer research 6, 27-37.

Wang, D., and Dubois, R.N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. Oncogene 29, 781-788.

Wang, H., and Chakrabarty, S. (2003). Platelet-activating factor activates mitogen-activated protein kinases, inhibits proliferation, induces differentiation and suppresses the malignant phenotype of human colon carcinoma cells. Oncogene 22, 2186-2191.

Wang, J., Ma, L., Weng, W., Qiao, Y., Zhang, Y., He, J., Wang, H., Xiao, W., Li, L., Chu, Q., et al. (2013a). Mutual interaction between YAP and CREB promotes tumorigenesis in liver cancer. Hepatology 58, 1011-1020.

Wang, P., Bai, Y., Song, B., Wang, Y., Liu, D., Lai, Y., Bi, X., and Yuan, Z. (2011). PP1A-mediated dephosphorylation positively regulates YAP2 activity. PLoS one 6, e24288.

Wang, R., Kwon, I.K., Singh, N., Islam, B., Liu, K., Sridhar, S., Hofmann, F., and Browning, D.D. (2014). Type 2 cGMP-dependent protein kinase regulates homeostasis by blocking c-Jun N-terminal kinase in the colon epithelium. Cell death and differentiation 21, 427-437.

Wang, W., Huang, J., Wang, X., Yuan, J., Li, X., Feng, L., Park, J.I., and Chen, J. (2012). PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. Genes & development 26, 1959-1971.

Wang, Y., Xie, C., Li, Q., Xu, K., and Wang, E. (2013b). Clinical and prognostic significance of Yes-associated protein in colorectal cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 34, 2169-2174.

Waters, J., and Cunningham, D. (2001). The changing face of chemotherapy in colorectal cancer. British journal of cancer 84, 1-7.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiological reviews 79, 143-180.

Williams, C.S., Luongo, C., Radhika, A., Zhang, T., Lamps, L.W., Nanney, L.B., Beauchamp, R.D., and DuBois, R.N. (1996). Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. Gastroenterology 111, 1134-1140.

Williams, C.S., Watson, A.J., Sheng, H., Helou, R., Shao, J., and DuBois, R.N. (2000). Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. Cancer research 60, 6045-6051.

Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R., and Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. The New England journal of medicine 340, 1888-1899.

Xiao, H., Zhang, Q., Lin, Y., Reddy, B.S., and Yang, C.S. (2008). Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. International journal of cancer *Journal international du cancer* 122, 2115-2124.

Yang, J.Q., Rudiger, J.J., Hughes, J.M., Goulet, S., Gencay-Cornelson, M.M., Borger, P., Tamm, M., and Roth, M. (2008). Cell density and serum exposure modify the function of the glucocorticoid receptor C/EBP complex. American journal of respiratory cell and molecular biology 38, 414-422.

Yang, S., Zhang, L., Liu, M., Chong, R., Ding, S.J., Chen, Y., and Dong, J. (2013). CDK1 phosphorylation of YAP promotes mitotic defects and cell motility and is essential for neoplastic transformation. Cancer research 73, 6722-6733.

Yang, S.Y., Miah, A., Sales, K.M., Fuller, B., Seifalian, A.M., and Winslet, M. (2011). Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. Int J Oncol 38, 1695-1702.

Yang, W.N., Ma, K.G., Qian, Y.H., Zhang, J.S., Feng, G.F., Shi, L.L., Zhang, Z.C., and Liu, Z.H. (2015). Mitogen-activated protein kinase signaling pathways promote low-density lipoprotein receptor-related protein 1-mediated internalization of beta-amyloid protein in primary cortical neurons. The international journal of biochemistry & cell biology 64, 252-264.

Yoshida, S., Fukino, K., Harada, H., Nagai, H., Imoto, I., Inazawa, J., Takahashi, H., Teramoto, A., and Emi, M. (2001). The c-Jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. Journal of human genetics 46, 182-187.

Yoshimi, N., Shimizu, M., Matsunaga, K., Yamada, Y., Fujii, K., Hara, A., and Mori, H. (1999). Chemopreventive effect of N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methane sulfonamide (NS-398), a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. Japanese journal of cancer research : Gann 90, 406-412.

Zhang, L., Tang, F., Terracciano, L., Hynx, D., Kohler, R., Bichet, S., Hess, D., Cron, P., Hemmings, B.A., Hergovich, A., et al. (2015a). NDR functions as a physiological YAP1 kinase in the intestinal epithelium. Current biology : CB 25, 296-305.

Zhang, T., Li, X., Du, Q., Gong, S., Wu, M., Mao, Z., Gao, Z., Long, Y., Jin, T., Geng, T., et al. (2014a). DUSP10 gene polymorphism and risk of colorectal cancer in the Han Chinese population. European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation 23, 173-176.

Zhang, W., Nandakumar, N., Shi, Y., Manzano, M., Smith, A., Graham, G., Gupta, S., Vietsch, E.E., Laughlin, S.Z., Wadhwa, M., et al. (2014b). Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma. Science signaling 7, ra42.

Zhang, Y., Blattman, J.N., Kennedy, N.J., Duong, J., Nguyen, T., Wang, Y., Davis, R.J., Greenberg, P.D., Flavell, R.A., and Dong, C. (2004). Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. Nature 430, 793-797.

Zhang, Y., Nguyen, T., Tang, P., Kennedy, N.J., Jiao, H., Zhang, M., Reynolds, J.M., Jaeschke, A., Martin-Orozco, N., Chung, Y., et al. (2015b). Regulation of Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by MAPK Phosphatase 5. The Journal of biological chemistry *290*, 14875-14883.

Zhang, Y.Y., Wu, J.W., and Wang, Z.X. (2011). A distinct interaction mode revealed by the crystal structure of the kinase p38alpha with the MAPK binding domain of the phosphatase MKP5. Science signaling *4*, ra88.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). Genes & development *24*, 72-85.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. Genes & development *21*, 2747-2761.

Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J.E., Markowitz, S.D., Camargo, F.D., et al. (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, E1312-1320.

Zhou, Z., Hu, T., Xu, Z., Lin, Z., Zhang, Z., Feng, T., Zhu, L., Rong, Y., Shen, H., Luk, J.M., et al. (2015). Targeting Hippo pathway by specific interruption of YAP-TEAD interaction using cyclic YAP-like peptides. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *29*, 724-732.

Zidar, N., Odar, K., Glavac, D., Jerse, M., Zupanc, T., and Stajer, D. (2009). Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform?. Journal of cellular and molecular medicine *13*, 3753-3763.

Zuluaga, S., Gutierrez-Uzquiza, A., Bragado, P., Alvarez-Barrientos, A., Benito, M., Nebreda, A.R., and Porras, A. (2007). p38alpha MAPK can positively or negatively regulate Rac-1 activity depending on the presence of serum. FEBS letters *581*, 3819-3825.

ANEXO I: PUBLICACIONES